



Universidade Federal de Uberlândia



Pós-graduação em Química

OTIMIZAÇÃO DE UMA CLASSE DE BENZENOSSULFONAMIDAS
COMO AGENTES ANTI-*TRYPANOSOMATIDAE*: PLANEJAMENTO,
SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA CONTRA O *TRYPANOSOMA CRUZI*
E *LEISHMANIA INFANTUM*

Guilherme Freitas de Lima Hercos

Dissertação de mestrado

Uberlândia

2023

Guilherme Freitas de Lima Hercos

OTIMIZAÇÃO DE UMA CLASSE DE BENZENOSSULFONAMIDAS
COMO AGENTES ANTI-*TRYPANOSOMATIDAE*: PLANEJAMENTO,
SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA CONTRA O *TRYPANOSOMA CRUZI*
E *LEISHMANIA INFANTUM*

Dissertação de mestrado apresentada ao programa
de Pós-graduação em Química, área de
concentração: Química, Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito para obtenção do título
de Mestre em Química.

Area de concentração: Química Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Jr

Uberlândia

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

H539
2023 Hercos, Guilherme Freitas de Lima, 1999-
Otimização de uma classe de benzenossulfonamidas como
agentes anti-Trypanosomatidae [recurso eletrônico] :
Planejamento, síntese e avaliação biológica contra o
Trypanosoma cruzi e Leishmania infantum / Guilherme
Freitas de Lima Hercos. - 2023.

Orientador: Celso de Oliveira Rezende Junior Rezende
Junior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.494>

Inclui bibliografia.

1. Química. I. Rezende Junior, Celso de Oliveira
Rezende Junior, 1987-, (Orient.). II. Universidade
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III.
Título.

CDU: 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 380, PPGQUI				
Data:	Oito de agosto de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14h	Hora de encerramento:	17:15
Matrícula do Discente:	12122QMI005				
Nome do Discente:	Guilherme Freitas de Lima Hercos				
Título do Trabalho:	“Otimização de uma classe de benzenossulfonamidas como agentes anti-Trypanosomatidae: Planejamento, síntese e avaliação biológica contra o Trypanosoma cruzi e Leishmania infantum.”				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Planejamento e síntese de candidatos a fármacos				

Reuniu-se por webconferência, *link* <https://conferenciaweb.rnp.br/ufu/defesa-de-mestrado-guilherme-hercos>, da Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Maurício Silva dos Santos, da Universidade Federal de Itajubá; Rafaela Salgado Ferreira, Universidade Federal de Minas Gerais e Celso de Oliveira Rezende Júnior, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Celso de Oliveira Rezende Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 08/08/2023, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maurício Silva dos Santos, Usuário Externo**, em 08/08/2023, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafaela Salgado Ferreira, Usuário Externo**, em 09/08/2023, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4682313** e o código CRC **5BA56E38**.

Ao meu avô, Rômulo N. Hercos, que foi a minha maior referência como homem nessa vida.

Aos meus pais, Rodrigo e Graziela Hercos, que moldaram o meu caráter e sempre me apoiaram.

A minha esposa, Nathália M. Barros, o amor da minha vida.

E ao meu filho, Arthur M. Hercos, que é o motivo da minha vida.

Dedico.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as oportunidades que me foram dadas ao longo da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Graziela e Rodrigo, e ao meu irmão, Adriel, por serem uma família excepcional. Certamente a união e harmonia dessa família constituíram toda a base para as minhas conquistas, dentre as quais está dissertação.

Agradeço a minha esposa e companheira Nathália, por todo amor, carinho, paciência e apoio ao longo desse período.

Agradeço ao meu filho, Arthur, o qual o seu nascimento mudou por completo a minha vida e mesmo não tendo a mínima ideia do que é química, contribui para a construção desse texto.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Jr, pela confiança, apoio e ensinamentos durante esses últimos 2 anos de convivência.

Agradeço aos meus amigos e colegas do laboratório LaSFar, Douglas D. Oliveira e Meiry L. de Lacerda, Flávia C. Dias e Danilo N. Farago, Raphael Tristão e Ieda Vieira Cunha.

A todos os professores, em especial ao Prof. Dr. Wendell Guerra, e alunos do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu crescimento profissional.

Agradeço aos membros da banca de defesa, Profa. Dra. Rafaela Salgado Ferreira e Prof. Dr. Mauricio Silva dos Santos, e a Profa. Dr. Tayana Mazin Tsubone, membro da banca de qualificação, pela disponibilidade, leitura e avaliação do presente trabalho.

A todos os funcionários e técnicos administrativos da UFU (secretários, técnicos de laboratório, zeladoria, biblioteca etc.). Em especial, ao Dr. José Henrique Faleiros pela amizade ao longo desses anos.

Às agências financiadoras, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudo concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a FIOCRUZ-MG pelas colaborações no projeto.

Demore o tempo que for para ver o que você quer da vida, e depois que decidir, não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir!

Friedrich Nietzsche

Formação Acadêmica

Graduação

Licenciatura em Química pelo Instituto Federal Goiano (IF Goiano) – campus Rio Verde.

Ano de conclusão: 2021

Produção Acadêmica

Participação em congressos e eventos científicos

XXXIV Encontro da Sociedade Brasileira de Química – MG, Belo Horizonte – MG, dezembro de 2022

Apresentação de trabalhos em congressos

HERCOS, G. F. L.; RESENDE, D. M.; MARTINHO, A. C. C.; FARAGO, D. N.; MURTA, S. M. F.; REZENDE JR, C. O. Síntese e estudo da relação entre a estrutura e atividade biológica de uma série de sulfonamida potente contra o *Trypanosoma cruzi*. XXXIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – MG. 2022. (Poster)

Resumo

A doença de Chagas e a leishmaniose visceral humana (LVH) são enfermidades de origem parasitárias causadas pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e *Leishmania infantum* (*L. infantum*), respectivamente, ambos da família de protozoários *Trypanosomatidae*, consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doenças tropicais negligenciadas. Os medicamentos disponíveis atualmente para o combate dessas doenças são: o benznidazol para a doença de Chagas, contudo, esse detém de uma eficiência moderada na fase aguda da parasitose, além de causar uma série de efeitos colaterais que levam em alguns casos o abandono do tratamento por parte das vítimas; e a anfotericina B para LVH, esse fármaco tem uma certa eficiência no tratamento dessa doença, porém sua aquisição é cara, além de ser tóxico para a saúde humana. Diante desse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos, mais eficientes, menos tóxicos e de baixo custo para o tratamento dessas patologias. Neste trabalho, foi descrito o planejamento, a síntese e o estudo da relação entre a estrutura química e atividade biológica de 23 compostos de uma série de benzenossulfonamidas potentes contra parasitas da família *Trypanosomatidae*. Esse projeto se iniciou a partir do planejamento das modificações de um hit da classe sulfonamida, onde foi estabelecido que seriam modificados os fragmentos amino-arila e benzenossulfonila do hit. No fragmento amino-arila, foram realizadas modificações nas posições do substituinte do anel aromático, a troca do grupo amino por outros grupos funcionais. Derivados como os anteriores foram realizados com a adição da carbonila entre a piperazina e o anel aromático desse fragmento. No fragmento da benzenossulfonila, foram realizadas modificações nos substituintes ligados ao anel aromático. Com os compostos sintetizados e caracterizados, esses foram testados para verificar a atividade biológica *in vitro* contra a forma amastigota do *T. cruzi* e do *L. infantum* em cultivo celular. Das modificações do fragmento amino-arila, o composto mais potente contra o *T. cruzi* foi o **4b** ($IC_{50} T. cruzi = 7,1 \pm 4,8 \mu M$; IS = 71,17) e contra *L. infantum* foi **7** ($IC_{50} L. infantum = 0,90 \mu M$; IS = >2457,7). Da série de modificações do fragmento benzenossulfonila o composto mais potente contra *T. cruzi* foi o **11g** ($IC_{50} T. cruzi = 1,70 \pm 0,09 \mu M$; IS = 177) e contra *L. infantum* foi o **11a** ($IC_{50} L. infantum = 6,06 \pm 1,69 \mu M$; IS = 404,7). Os resultados obtidos até o momento são de grande valor para o estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica, além de serem promissores na busca por novos candidatos a fármacos contra a doença de Chagas e a leishmaniose visceral humana.

Palavras-Chaves: Benzenossulfonamidas. *T. cruzi*. *L. infantum*.

Abstract

Chagas disease and human visceral leishmaniasis (HVL) are parasitic diseases caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and *Leishmania infantum* (*L. infantum*), respectively, both of the *Trypanosomatidae* protozoan family, considered by the World Health Organization as neglected tropical diseases. The drugs currently available to combat these diseases are: benznidazole for Chagas disease, however, it has a moderate efficiency in the acute phase of parasitosis, in addition to causing a series of side effects that lead in some cases to the abandonment of treatment by the victims; and amphotericin B for VLH, this drug has a certain efficiency in the treatment of this disease, but its acquisition is expensive, in addition to being toxic to human health. Given this context, it is necessary to develop new drugs, more efficient, less toxic and low cost for the treatment of these pathologies. In this work, the design, synthesis and study of the relationship between the chemical structure and biological activity of 23 compounds of a series of potent benzenesulfonamides against parasites of the *Trypanosomatidae* family were described. This project started from the planning of the modifications of a hit of the sulfonamide class, where it was established that the amino-aryl and benzenesulfonyl fragments of the hit would be modified. In the amino-aryl fragment, modifications were made in the positions of the substituent of the aromatic ring, the exchange of the amino group for other functional groups. Derivatives as above were performed with the addition of the carbonyl between the piperazine and the aromatic ring of this fragment. In the benzenesulfonyl fragment, modifications were made to the substituents attached to the aromatic ring. With the synthesized and characterized compounds, they were tested to verify the biological activity in vitro against the amastigote form of *T. cruzi* and *L. infantum* in cell culture. Of the modifications of the amino-aryl fragment, the most potent compound against *T. cruzi* was **4b** (IC_{50} *T. cruzi* = 7.1 ± 4.8 μ M; IS = 71.17) and against *L. infantum* was **7** (IC_{50} *L. infantum* = 0.90 μ M; IS = >2457.7). From the series of modifications of the benzenesulfonyl fragment the most potent compound against *T. cruzi* was **11g** (IC_{50} *T. cruzi* = 1.70 ± 0.09 μ M; IS = 177) and against *L. infantum* was **11a** (IC_{50} *L. infantum* = 6.06 ± 1.69 μ M; IS = 404.7). The results obtained so far are of great value for the study of the relationship between chemical structure and biological activity, and are promising in the search for new drug candidates against Chagas disease and human visceral leishmaniasis.

Key-words: Benzenesulfonamides. *T. cruzi*. *L. infantum*.

Lista de abreviaturas e siglas

ADME: Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

AcOEt: Acetato de etila

Boc: *Terc*-butiloxicarbonil

Bz: Benznidazol

CCD: Cromatografia em camada delgada

CDC: Centros de Controle e Prevenção de Doenças

CC₅₀: Concentração citotóxica para redução de 50% da viabilidade celular

d: Duplete

dd: Duplete de duplete

δ: Deslocamento químico

DCM: Diclorometano

DMF: *N, N*-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNTs: Doenças tropicais negligenciadas

EDC: Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Et₃N: Trietilamina

Hex: Hexano

HOBt: *N*-hidroxibenzotriazol

IC₅₀: Concentração para inibição de 50% do alvo

IS: Índice de Seletividade

J: Deslocamento químico

L. infantum: *Leishmania infantum*

LVH: Leishmaniose visceral humana

MeOH: Metanol

MeOD: Metanol deuterado

m: Multiplete

RMN: Ressonância magnética nuclear

RNA: Ácido ribonucleico

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

t: Tripleto

t.a.: Temperatura ambiente

TMS: Tetrametilsilano

Lista de figuras

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	15
Figura 2 - Representação estrutural dos fármacos utilizados para tratamento de Chagas.....	16
Figura 3 - Casos de leishmaniose visceral por município de infecção em 2021.....	17
Figura 4 - Ciclo de vida da <i>L. infantum</i>	18
Figura 5 - Representações estruturais dos fármacos utilizados para tratamento da LVH.....	19
Figura 6 - Representação estrutural e resultados biológicos do hit.....	20
Figura 7 - Representação das modificações e conclusões realizadas por Martinho et al, 2022.....	22
Figura 8 - Retrossíntese do hit e fragmentos a serem modificados.....	23
Figura 9 - Rota sintética para a obtenção dos análogos das modificações no fragmento amino-árla benzenossulfonila.....	24
Figura 10 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 4a	25
Figura 11 - Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) do composto 4a	26
Figura 12 - Rota sintética para a obtenção dos análogos das modificações no fragmento amino-árla com a adição da carbonila entre a piperazina e o anel aromático.....	27
Figura 13 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 7d	29
Figura 14 - Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) do composto 7d	29
Figura 15 - Rota sintética para a obtenção dos análogos das modificações no fragmento amino-árla benzenossulfonila.....	36
Figura 16 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 11g	38
Figura 17 - Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) do composto 11g	38
Figura 18 - Conclusões obtidas pelo estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica contra o <i>T. cruzi</i>	45

Figura 19 - Conclusões obtidas pelo estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica contra o <i>L. infantum</i>	45
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de tabelas

Tabela 1 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 4a (CDCl_3).....	26
Tabela 2 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 7d (CDCl_3).....	30
Tabela 3 - Resultados biológicos das modificações no fragmento amino-arila.....	31
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 11g (CDCl_3).....	39
Tabela 5 - Resultados biológicos das modificações no fragmento benzenossulfonila..	40

Sumário

1 - Introdução.....	13
1.1 - A doença de Chagas	13
1.1.1 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	14
1.1.2 - Tratamentos disponíveis para a doença de Chagas	15
1.2 - Leishmaniose visceral humana.....	16
1.2.1 - Ciclo de vida da <i>L. infantum</i>	17
1.2.2 - Tratamentos disponíveis para a Leishmaniose visceral humana.....	18
1.3 - Desenvolvimento de novos fármacos.....	19
2 – Objetivos.....	21
2.1 – Objetivo geral	21
2.2 – Objetivos específicos.....	21
3 - Resultados e Discussões.....	21
3.1 - Planejamento das modificações no hit	22
3.2 - Síntese das modificações do fragmento amino-arila do hit	23
3.2.1 - Síntese das modificações do fragmento amino-arila com a adição da carbonila entre a piperazina e o anel aromático	27
3.3 - Resultados biológicos e estudo da relação entre a estrutura química e a atividade anti- <i>T. cruzi</i> e anti – <i>L. infantum</i> das modificações no fragmento amino-arila.....	30
3.4 - Sínteses das modificações do fragmento benzenossulfonila do hit.....	35
3.5 - Resultados biológicos e estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica das modificações no fragmento benzenossulfonila contra <i>T. cruzi</i> e <i>L. infantum</i>	39
4 - Conclusões	46
5 - Perspectivas.....	47
6 - Métodos e Materiais	47
6.1 - Reagentes e Solventes	47

6.2 - Métodos Cromatográficos	47
6.3 - Método analítico.....	48
6.3.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética	48
6.4 - Procedimento experimental (sínteses).....	48
6.5 - Procedimento Experimental (Biológico).....	57
6.5.1 - Ensaio <i>in vitro</i> contra as formas amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Tulahuen lacZ C4).....	57
6.5.1.1 - Manutenção de células para plaqueamento	57
6.5.1.2 - Plaqueamento das células, infecção e tratamento	58
6.5.2 - Ensaio alamarBlue®	58
6.5.2.1 - Manutenção de células para plaqueamento	58
6.5.2.2 - Plaqueamento das células e tratamento	59
6.5.3 - Ensaios <i>in vitro</i> contra <i>L. infantum</i>	59
6.5.3.1 - Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> : método fluorimétrico	59
6.5.3.2 - Avaliação da citotoxicidade em macrófagos derivados de células THP-1	59
7 - Referências bibliográficas	60
Anexo	63

1 - Introdução

As doenças tropicais negligenciadas (DNTs) são um conjunto de enfermidades predominantes em regiões tropicais do mundo afetando principalmente as populações de baixa renda e em condições sanitárias precárias (HOTEZ et al, 2020). O termo “doenças negligenciadas” se deve ao desinteresse das indústrias farmacêuticas tradicionais em pesquisar e desenvolver novos medicamentos e tratamentos para o combate dessas patologias, pois essas empresas não veem retorno financeiro em tais investimentos, bem como o descaso dos órgãos governamentais em conscientizar as populações sobre os meios de prevenção a essas doenças. Como resultado dessas negligências, ocorrem deficiências físicas e psicológicas nas vítimas, estigmatização, exclusão social, discriminação e pressão financeira aos pacientes e suas famílias devido à redução ou incapacidade de trabalho dos seus membros (DNDi, 2023 e WHO, 2023).

Dentre as DNTs, se destacam a doença de Chagas e a Leishmaniose visceral, essas patologias são causadas por protozoários flagelados da família *Trypanosomatidae*. Ambas as doenças são endêmicas na América Latina, com o registro de casos se concentrando nas regiões tropicais (MEADE, 2019).

1.1 - A doença de Chagas

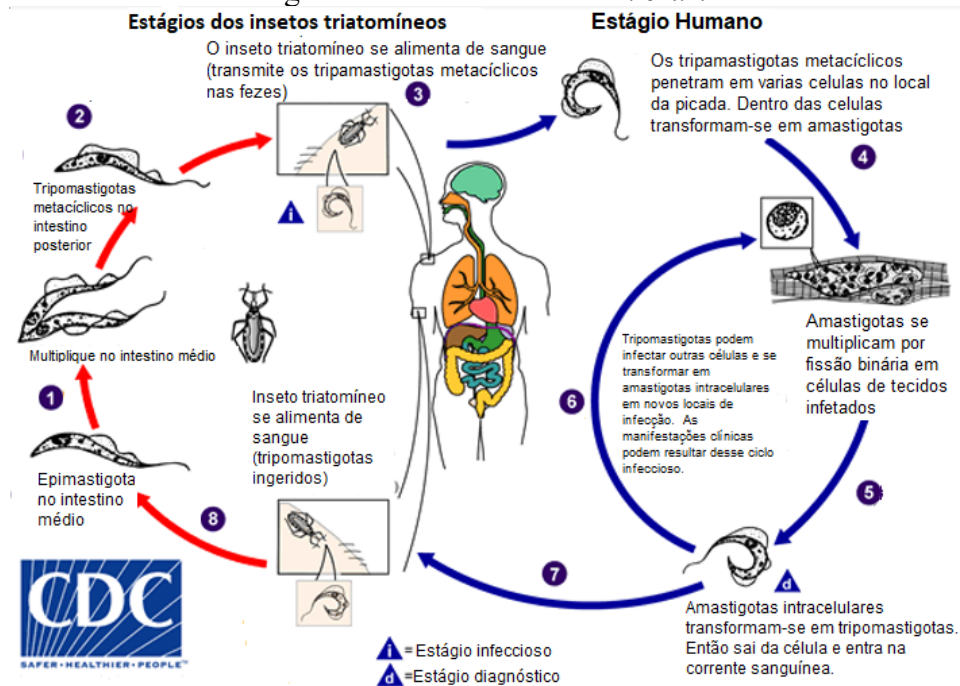
A tripanossomíase americana, conhecida como doença de Chagas, é uma enfermidade parasitária potencialmente fatal, sendo o seu agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e o principal vetor o *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como barbeiro. Essa doença foi descrita inicialmente pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas em 1909 na região norte do Brasil. Estima-se que cerca de 6 a 8 milhões de seres humanos estejam infectados com o *T. cruzi* em todo o mundo e mais de 14 mil pessoas sucumbam a essa parasitose todos os anos (WHO, 2022; COURA, 2015).

A doença de Chagas é considerada uma patologia endêmica em 21 países da América Latina, que apresenta um perfil epidemiológico de surtos, concentrados em especial na região Amazônica. É nessa área que uma das formas modernas de transmissão do *T. cruzi* se concentra, a ingestão de alimentos contaminados com barbeiro infectado ou com as fezes desse inseto, principalmente através do consumo do açaí in natura, um alimento típico da cultura local e que nem sempre passa pelos devidos procedimentos de limpeza (MSF, 2023; MESSENGER e BERN, 2018; HOWARD et al, 2014; COURA, 2015). Para além das terras latinas, estão ocorrendo relatos do parasita em nações não endêmicas como Estados Unidos da América,

Austrália, Espanha, entre outros. A principal justificativa para isso é que imigrantes latinos não diagnosticados acabam transmitindo o *T. cruzi* para a população local através de, por exemplo, transfusões de sangue contaminados, doação de órgãos contaminados, forma congênita, mães infectadas que passam para os filhos durante a gestação. Esse fato evidencia uma das grandes lacunas no estudo clínico da doença que é a falta de um diagnóstico conclusivo (LIDANI, 2019; DNDi, 2021; HOWARD et al, 2014).

1.1.1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* (figura 1) é amplamente conhecido e um dos principais exemplos de ciclo heteroxênico, ou seja, apresenta tanto um hospedeiro invertebrado, insetos hemípteros da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, caracterizados como vetores, como também um hospedeiro vertebrado, mamíferos em geral, incluindo o ser humano. Os insetos do gênero *Triatoma*, em especial a espécie *Triatoma infestans*, são os hospedeiros invertebrados do *T. cruzi* que estão localizados no intestino médio desses animais na forma epimastigota, forma essa que se caracteriza como replicante por divisão binária e não infectante (1). Quando os epimastigotas passam para o intestino posterior do barbeiro, esses se diferenciam em uma nova conformação, os tripomastigotas metacíclicos, forma não replicante, porém infecciosa do parasita (2). Quando o inseto se alimenta do sangue de mamíferos, ele defeca logo em seguida próximo da picada e em um impulso involuntário, a vítima acaba coçando a região da ferida, levando as fezes contaminadas com tripomastigotas metacíclicos para dentro do hospedeiro (3). Dentro, os tripomastigotas invadem as células nas proximidades do local da ferida, diferenciam-se na forma amastigota do *T. cruzi*, que se caracteriza como replicante por divisão binária e não infectante (4). Ocorre então, a diferenciação da forma amastigota para a forma infectante tripomastigota, que são liberadas na corrente sanguínea para infectar novas células, especialmente as células cardíacas e intestinais (5). Dentro dessas novas células, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, se multiplicam, diferenciam-se em tripomastigotas, caem na corrente sanguínea e infectam novas células, mantendo assim, um ciclo infectante (6). Um barbeiro infecta-se ao se alimentar do hospedeiro vertebrado, ingerindo assim a forma tripomastigota que estava na corrente sanguínea da vítima (7). No trato intestinal do *Triatoma infestans*, a forma tripomastigota se transforma na forma epimastigota, dando continuidade ao ciclo de vida do *T. cruzi* (8) (CDC, 2022).

Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*.

Fonte: CDC adaptado

A doença de Chagas se desenvolve em duas fases distintas. A fase aguda se caracteriza por ser a fase inicial da doença, ocorrendo entre 6 e 8 semanas após a infecção, onde há a presença de uma grande quantidade de parasitas na corrente sanguínea do hospedeiro e as manifestações sintomáticas, quando ocorrem, são parecidas com infecções comuns, o que dificulta o diagnóstico nessa etapa, o que é problemático já que é na fase inicial da doença que ainda há tempo de curá-la. A fase crônica tem como característica a baixa concentração de parasitas na corrente sanguínea e a baixa possibilidade de cura. Nessa etapa, o *T. cruzi* se limita às células cardíacas ou intestinais, sendo incomum o diagnóstico nos primeiros anos dessa fase, os sintomas são manifestados após 10 ou 30 anos da infecção, sendo essa etapa potencialmente fatal, já que a doença de Chagas pode provocar o aumento das estruturas cardíacas e/ou intestinais, levando a falência desses órgãos (FRANCISCO, 2016).

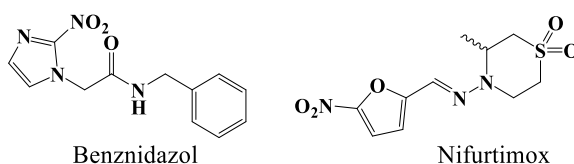
1.1.2 - Tratamentos disponíveis para a doença de Chagas

Os tratamentos disponíveis atualmente contra a doença de Chagas consistem em dois fármacos, o benznidazol (Bz), produzido pela LAFEPE, e o nifurtimox, produzido pela Bayer (Figura 2). Os dois se caracterizam como nitro-heterociclos, pró-fármacos, exercendo uma atividade tripanocida após ativação do metabolismo e a produção de metabólitos reativos contra as formas tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*. Alguns estudos sugerem que o mecanismo de ação desses pró-fármacos se dê pela redução dos grupos nitros presentes em suas estruturas, pela enzima nitroreductase do parasita, produzindo uma série de metabólitos que podem

Hercos, G. F. L.

promover danos a várias macromoléculas, como o DNA e o RNA. Porém, esses medicamentos são eficazes apenas durante a fase aguda da doença, além de provocarem efeitos colaterais graves, que incluem dermatite alérgica, prurido, febre e intolerância gastrointestinal, resultando no abandono do tratamento em aproximadamente 20-25% dos pacientes. No Brasil, apenas o benznidazol é liberado para o tratamento da doença de Chagas (VIOTTI, 2009; COURA, 2015; RAJAO et al, 2014).

Figura 2 – Representações estruturais dos fármacos utilizados para tratamento da doença de Chagas.

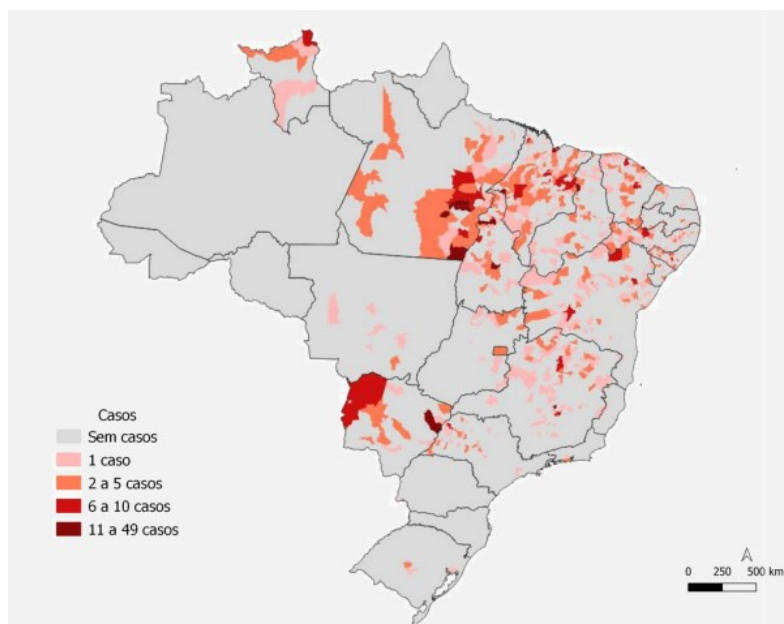


Fonte: Autor

1.2 - Leishmaniose visceral humana

A Leishmaniose visceral humana (LVH), mais conhecida como calazar, é uma doença parasitaria causada pelo protozoário flagelado *Leishmania infantum* (*L. infantum*). A doença foi identificada pela primeira vez na Índia. Em 1901, W.B. Leishman deu o nome ao protozoário, identificando-o em baço de paciente com febre Dum Dum. No ano de 1908, a doença foi descrita no velho mundo pela primeira vez pelo médico francês Charles Nicolle. No ano de 1937, uma equipe liderada pelo médico brasileiro Evandro Chagas descreveu a espécie *Leishmania infantum chagasi* como o agente etiológico da Leishmaniose visceral americana (BENCHIMOL, 2019). O vetor dessa doença são as fêmeas dos insetos da subfamília *Flebotomíneos*, conhecidas como mosquito-palha, tatuquira ou birigui, sendo que nos países europeus e asiáticos os insetos do gênero *Phlebotomus* é o principal transmissor da calazar; nas Américas os mosquitos do gênero *Lutzomyia* são os responsáveis por disseminar o parasita (READY, 2014). Por ano ocorrem mais de 500 mil de casos da doença no mundo e estima-se que mais 350 milhões de seres humanos estejam em situação de risco de contrair os protozoários *Leishmania*. A LVH é uma enfermidade endêmica em 76 países, o Brasil, juntamente com Bangladesh, Sudão, Nepal e a Índia, representam mais de 90% dos casos no mundo (FARIAS, 2019). Os registros da doença em território brasileiro são maiores nas regiões norte e nordeste do país (Figura 3) (MINISTERIO DA SAUDE, 2023).

Figura 3 - Casos de leishmaniose visceral por município de infecção em 2021.



Fonte: Ministério da Saúde, 2021

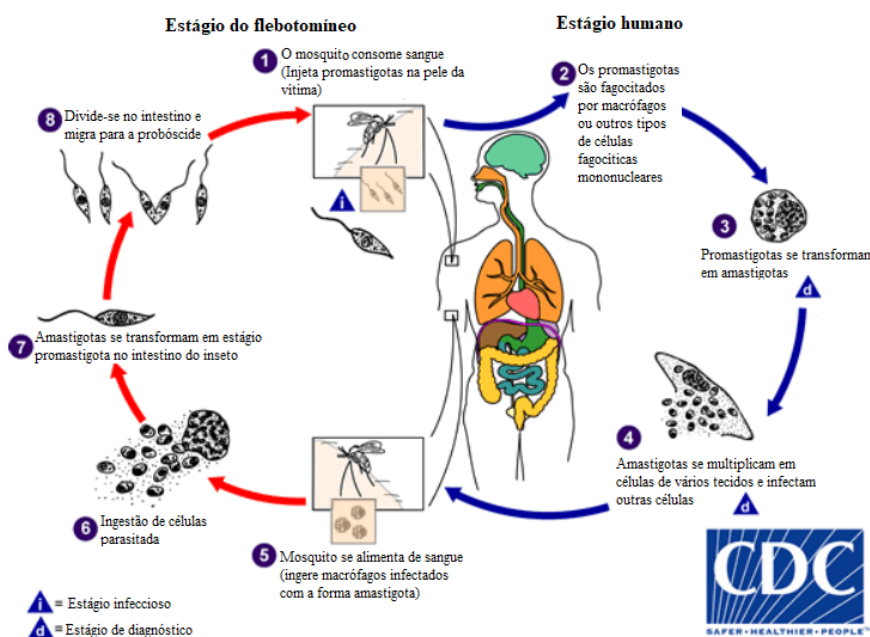
1.2.1 - Ciclo de vida da *L. infantum*

O ciclo de vida da *L. infantum* (Figura 4) é bastante conhecido na literatura. A transmissão da doença ocorre em especial nas áreas rurais, onde há uma maior incidência dos mosquitos do gênero *Flebotomíneos*, porém devido o avanço das áreas urbanas e destruição da vegetação nativa, estão ocorrendo relatos da presença do mosquito-palha nas cidades. Além disso, o parasita *L. infantum* tem como hospedeiro os cães (*Canis lupus familiaris*), o que faz desses animais reservatórios do protozoário, porém os cachorros contaminados não transmite a doença, esse papel está reservado aos insetos do gênero *Flebotomíneos*, que podem picar os caninos, se infectarem e transmitirem a doença para os humanos (BENCHIMOL, 2019; READY, 2014; CDC, 2023).

Dessa forma, o ciclo de vida da *L. infantum* se inicia com a picada do mosquito-palha, sendo que no momento da alimentação do inseto, a tromba do animal que penetra na pele da vítima está contaminada com a forma infecciosa promastigota do protozoário (1). Esses são fagocitados (engolidos) por macrófagos (células de defesas) (2). Dentro dos macrófagos, os parasitas se diferenciam na forma replicante amastigota, multiplicando-se assim por divisão binária (3). As células de defesa são rompidas pelo protozoário e esses passam a atacar outros macrófagos monocelulares (4). Com o decorrer da infecção, o parasita passa a infectar células dos órgãos do sistema linfático, em especial o baço, além de infectar as células hepáticas. Caso um mosquito-palha não infectado se alimente de uma vítima com *L. infantum*, esse inseto *Hercos, G. F. L.*

contrai o protozoário (5, 6). No intestino dos *Flebotomíneos* as formas amastigotas se diferenciam-se em promastigotas (7), se multiplicam por divisão binária e migram para a proboscídea do mosquito-palha e podem assim serem transmitidas para um novo hospedeiro (8), continuando o ciclo da vida do parasita (CDC, 2023).

Figura 4 - Ciclo de vida da *Leishmania*.



Fonte: CDC adaptado

As pessoas infectadas com a *L. infantum* apresentam sintomas como febre de longa duração, anemia, perda de peso, hepatoesplenomegalia, astenia, dentre outros. Se não tratada, a doença pode gerar complicação como piodermites, infecções dos tratos urinário e respiratório, além de otite média aguda. Em casos graves, provocam hemorragias digestivas e a icterícias. Caso não haja um tratamento adequado, a leishmaniose visceral pode levar ao óbito, com uma taxa de mortalidade de 90% (FARIAS, 2019).

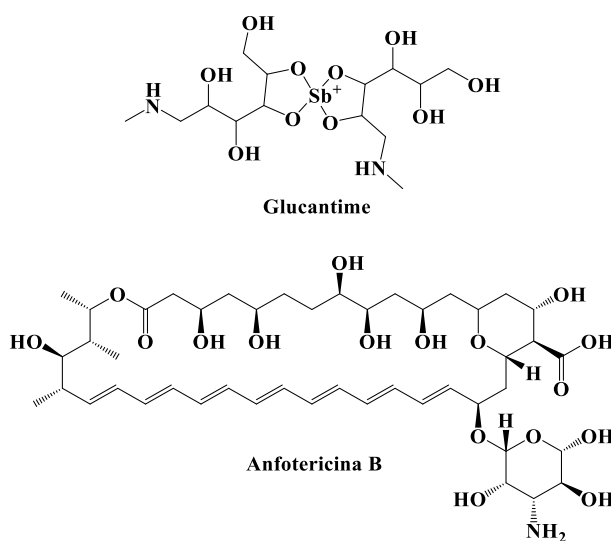
1.2.2 - Tratamentos disponíveis para a Leishmaniose visceral humana

O tratamento primário contra a LVH é a partir do uso do Glucantime (Figura 5), produzido pela Aventis, sendo esse o complexo metálico antimoniato de *N*-metilglucamina. Esse composto é usado desde 1912 para o tratamento das Leishmanioses e o mecanismo de ação, apesar de não ser totalmente elucidado, sugere que o fármaco atua na inibição de enzimas glicolíticas e na beta oxidação de ácidos graxos (FIOCRUZI, 2023). Apesar disso, esse medicamento apresenta uma alta toxicidade, em especial para o sistema cardiovascular e tem baixa eficiência em casos que o sistema imunológico do paciente está debilitado. Dentre os

efeitos colaterais associados tem-se febre, náusea, dispneia, erupção cutânea, artralgia, mialgia, anorexia e insuficiência renal (MOREIRA, 2017).

Como tratamento alternativo, em especial para casos de pacientes imunodeprimidos como os portadores do vírus HIV, tem-se utilizado da Anfotericina B (Figura 5), um medicamento padrão para o tratamento de infecção fúngicas e que tem um mecanismo de ação relacionado a capacidade desse antibiótico polieno de realizar ligações com os esteróis da membrana fúngica. Como as membranas das *Leishmanias* contêm ergosterol, o medicamento prejudica a permeabilidade celular dos protozoários, com perda de pequenos cátions, principalmente K^+ , causando assim morte celular do parasita. Apesar de eficiente no combate a *L. infantum*, a semelhança entre o ergosterol das *Leishmanias* e o colesterol de células de mamíferos, tornam a Anfotericina B muito tóxica para a saúde humana. Dentre os efeitos colaterais tem-se febre, calafrios, flebite, náusea, vômitos, cefaleia, anemia, trombocitopenia, leucopenia, insuficiência renal, entre outros (ORDÓNEZ-GUTIÉRREZ, 2007).

Figura 5 - Representações estruturais dos fármacos utilizados para tratamento da LVH.



Fonte: Autor

Diante dessas considerações, se justifica a busca por novos fármacos eficazes contra a doença de Chagas e a leishmaniose visceral humana, menos tóxicos para o corpo humano e acessível a todos os públicos.

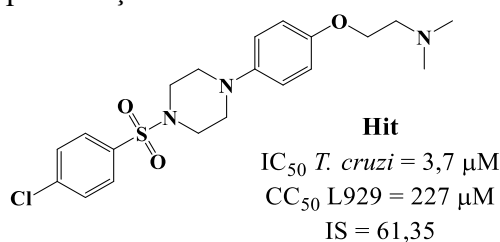
1.3 - Desenvolvimento de novos fármacos

Um dos principais processo de desenvolvimento de novos fármacos se inicia com a seleção de uma molécula protótipo, conhecida como hit. Para ser considerado um bom protótipo essa molécula precisa satisfazer alguns critérios específicos de cada alvo biológico estudado, Hercos, G. F. L.

sendo que para *T. cruzi* e *L. infantum* a concentração inibitória média (IC_{50}), que representa a concentração necessária para matar 50% da população de parasitas utilizada no ensaio biológico, seja inferior a 10 μM . Recomenda-se também que o hit tenha uma rota sintética simples (com até 5 etapas) e de baixo custo. Além disso, é preferível que o protótipo tenha uma alta concentração citotóxica média para células humanas (CC_{50}), que representa a capacidade dessa substância de matar células vitais do organismo do hospedeiro (KATSUNO et al, 2015).

Nesse trabalho, serão apresentados o planejamento, a síntese e os ensaios biológicos de uma série de modificação realizadas no hit (Figura 6). A seleção dessa molécula se deu a partir de uma análise detalhada do trabalho publicado em 2015 por Pena e colaboradores, onde mais de 1,8 milhão de compostos da quimioteca da farmacêutica Glaxo Smith Kline (GSK) foram testados contra *T. cruzi* a partir de uma triagem automatizada em grande escala. O hit selecionado pertence a classe sulfonamida, apresentando um grupo piperazina no centro da sua estrutura química, sendo que um dos nitrogênios desse heterociclo está ligado um grupo benzenossulfonila substituído na posição “*para*” do anel aromático por um cloro e o outro nitrogênio da piperazina está ligado a um grupo arila substituído na posição “*para*” do anel aromático por um grupo dimetilamino-etanolato. Pena reportou um IC_{50} *T. cruzi* = 0,6 μM e CC_{50} = 50 μM para esse hit, resultados bastantes promissores quando comparados ao do benznidazol (IC_{50} *T. cruzi* = 3,81 μM ; CC_{50} L929 = 2,381 μM ; IS = 625) (PENA et al, 2015). Essa molécula foi sintetizada e estudada anteriormente pelo grupo de pesquisa a qual o presente projeto foi desenvolvido, sendo que a síntese e os resultados biológicos foram reportados por Martinho e colaboradores em 2022, apresentando um IC_{50} *T. cruzi* = 3,7 μM e um CC_{50} L929 = 227 μM , comprovando assim a potência contra o *T. cruzi* (MARTINHO et al, 2022).

Figura 6 – Representação estrutural e resultados biológicos do hit.



Fonte: Martinho et al, 2022.

Devido ao grande número de pessoas infectadas, a falta de medicamentos eficientes e de fácil acesso para o tratamento e, considerando que segundo a Organização Mundial da Saúde, trata-se de uma doença negligenciada, se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes, menos tóxicos e de baixo custo para o tratamento da doença de Chagas. Dessa forma, o presente projeto visou contribuir para o desenvolvimento de novas moléculas potentes

contra o parasita *T. cruzi* a partir do planejamento de modificações estruturais em fragmentos do hit que não foram explorados por Martinho et al, 2022, a fim de obter derivados com melhores propriedades farmacológicas; da síntese e caracterização das moléculas planejadas; de ensaios biológicos dos derivados para determinar o IC₅₀ contra *T. cruzi* e o CC₅₀ L929; e do estudo da relação entre a atividade biológica e a estrutura química dos compostos sintetizados.

Além disso, devido à similaridade entre o *T. cruzi* e a *L. infantum*, sendo que os dois são parasitas flagelados da família *Trypanosomatidae*, as moléculas planejadas nesse trabalho também serão testadas contra as cepas da *L. infantum*, a fim de se determinar o IC₅₀ *L. infantum* e o CC₅₀ THP-1; e realizar o estudo da relação entre a atividade biológica e a estrutura química para essa espécie parasitária.

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

- Desenvolver processos de *hit-to-lead* a partir de um hit potente contra a doença de Chagas e leishmaniose visceral humana.

2.2 – Objetivos específicos

- Planejar e realizar modificações estruturais no hit;
- Sintetizar e caracterizar os compostos almejados por técnicas de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C (RMN);
- Determinar a atividade biológica contra as formas amastigota de *T. cruzi* e *L. infantum* e citotoxicidade dos compostos sintetizados;
- Obter uma relação entre estrutura química e atividade biológica.

3 - Resultados e Discussões

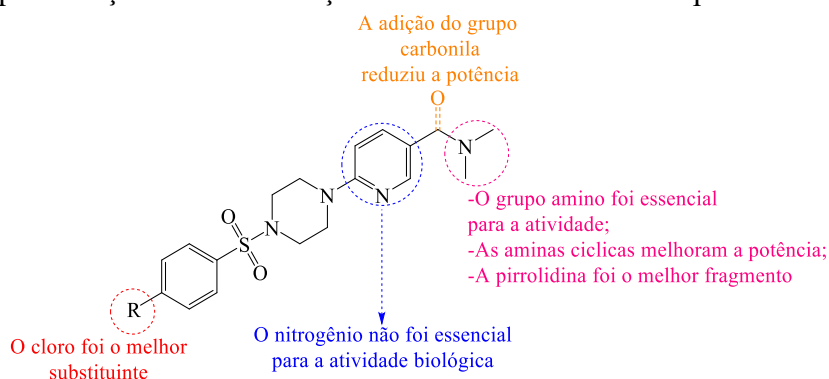
Todos os compostos sintetizados neste trabalho foram caracterizados por RMN de ¹H e ¹³C. Os ensaios biológicos foram feitos em parceria com a Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, do Instituto René Rachou da FIOCRUZ de Belo Horizonte. Os ensaios biológicos contra *T. cruzi* consistiram na determinação da potência (IC₅₀ *T. cruzi*) dos derivados sintetizados através de testes *in vitro* contra linhagens de células L929, uma linhagem celular de fibroblastos de camundongo infectada com a forma amastigota do *T. cruzi*. Além da potência, foram realizados ensaios para determinar a citotoxicidade (CC₅₀ L929) dos derivados do hit, contra células L929 do tecido conectivo de camundongos.

Para os ensaios biológicos contra *L. infantum* foram determinadas as atividades biológicas (IC_{50} *L. infantum*) dos derivados sintetizados contra macrófagos THP-1, uma linhagem de células monocíticas de leucemia humana, infectadas com a forma amastigota do parasita. Com a mesma linha celular foram realizados os testes para determinar citotoxicidade (CC_{50} *L. THP-1*).

3.1 - Planejamento das modificações no hit

No trabalho de Martinho et al, publicado em 2022, foram relatado as primeiras modificações realizadas no hit potente contra o *T. cruzi* utilizado nesse projeto, onde as modificações realizadas foram a introdução do nitrogênio no anel aromático ligado a piperazina (destacado em azul na figura 7), a adição da carbonila entre o grupo piridina e o grupo amino (destacado em alaranjado na figura 7), as modificações na cadeia carbônica ligado ao grupo amino (destacado em rosa na figura 7) e as modificações nos substituintes do anel aromático do grupo sulfonila (destacado em vermelho na figura 7). As conclusões de cada modificação estão descritas na figura 7.

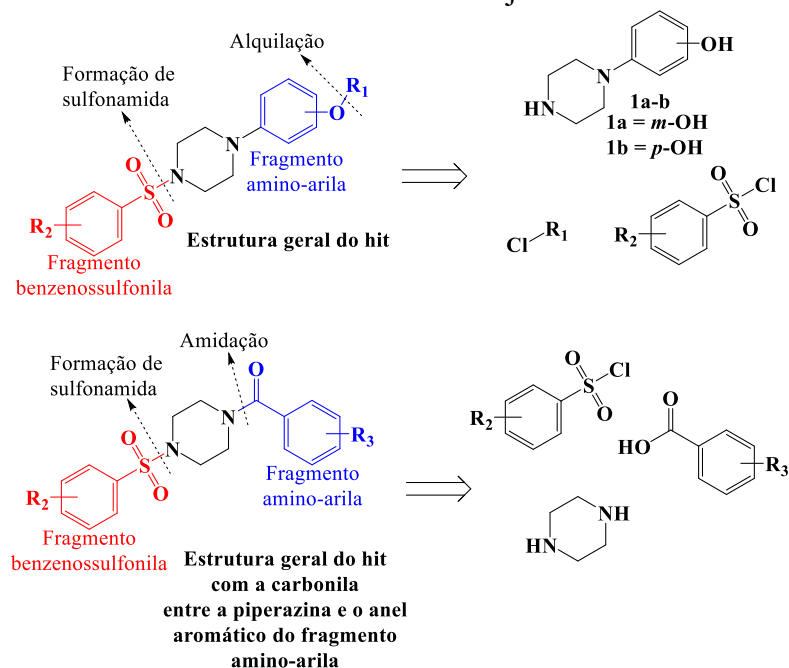
Figura 7 – Representação das modificações e conclusões realizadas por Martinho et al, 2022.



Fonte: Martinho et al, 2022, Adaptado.

O planejamento das modificações no hit para esse projeto foi baseado em uma análise retrossintética da estrutura química geral dessa molécula (Figura 8), bem como na análise retrossintética da estrutura geral de um derivado já sintetizado por Martinho que contém uma carbonila localizada entre a piperazina e o anel aromático do fragmento amino-arila; e na exploração de fragmentos não modificados por Martinho et al, 2022.

Figura 8 – Retrossíntese para a preparação dos compostos com modificações nos fragmentos benzenossulfonila e amino-arila almeçados neste trabalho.



Fonte: Autor

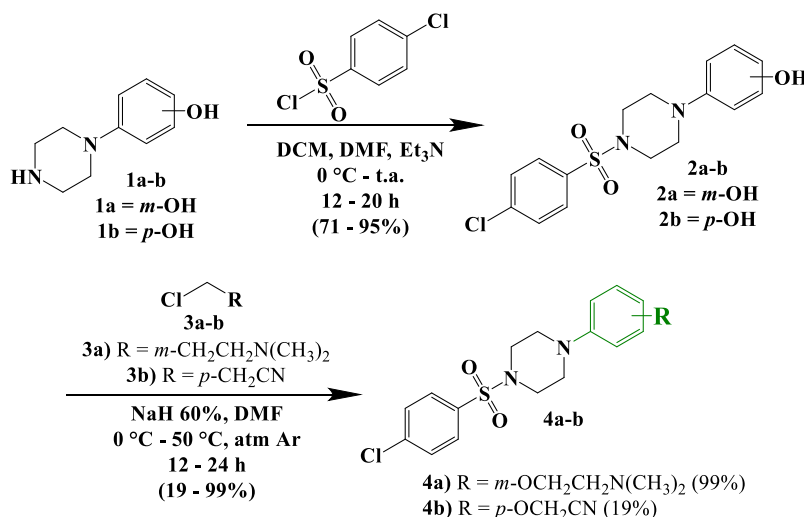
A análise retrossintética da estrutura geral do hit foi iniciada com a desconexão da ligação do átomo enxofre do fragmento benzenossulfonila com o átomo de nitrogênio do grupo piperazina, bem como a desconexão da ligação do átomo de oxigênio do fragmento amino-arila com uma cadeia alquílica, resultando assim nos materiais de partida para a síntese das modificações no hit, sendo eles os compostos **1a** (*m*-(piperazin-1-il) fenol) e **1b** (*p*-(piperazin-1-il) fenol), os cloretos de benzenossulfonila substituídos e os cloretos de alquila. Já a análise retrossintética da estrutura geral do hit com a carbonila entre a piperazina e o anel aromático do fragmento amino-arila teve início com a desconexão da ligação do átomo de enxofre do fragmento benzenossulfonila com o átomo de nitrogênio do grupo piperazina, assim como a desconexão da ligação entre a carbonila do fragmento amino arila com o átomo nitrogênio da piperazina, o que resultou nos cloretos de benzenossulfonila substituídos, nos derivados do ácido benzílico e na piperazina, composto esses que são os precursores das modificações a serem realizadas nessa molécula protótipo.

3.2 - Síntese das modificações do fragmento amino-arila do hit

Com o planejamento das modificações no hit e o estabelecimento das rotas sintéticas para a obtenção dos análogos dessa molécula protótipo, foi possível iniciar a parte de construção dos derivados. A figura 9 apresenta a sequência de reações utilizadas para a síntese dos análogos **4a-b**. O procedimento sintético iniciou com uma substituição nucleofílica na sulfonila do

cloreto de *p*-clorobenzenossulfonila pelos compostos **1a-b**, utilizando trietilamina (Et_3N) como base, diclorometano (DCM) e dimetilformamida (DMF) como solventes. Na etapa seguinte, realizou-se alquilações nos intermediários **2a-b** utilizando os cloretos de alquila **3a** e **3b**, hidreto de sódio como base e DMF anidro como solvente.

Figura 9 – Rota sintética para a obtenção dos análogos das modificações no fragmento amino-arila benzenossulfonila.



Fonte: Autor

Como resultado foi obtido com 99% de rendimento o derivado **4a** com o substituinte do anel aromático do fragmento amino-arila na posição “*meta*” em relação a piperazina. Esse derivado é importante para avaliar a contribuição da posição “*para*” do anel benzeno desse fragmento para a atividade tripanocida. Outro derivado obtido, foi o **4b** com um rendimento de 19%, sendo que sua importância reside na avaliação da influência da amina terciária do hit na atividade biológica, bem como o comportamento farmacológico da substituição de um grupo amino por uma nitrila.

Na figura 10 é apresentado o espectro de RMN ^1H do composto **4a**. Nesse foi observada a presença de dois dupletos (7,72 e 7,53 ppm) correspondentes aos quatro hidrogênios do anel aromático do fragmento benzenossulfonila (H2 a H5), um tripleto (7,14 ppm) e um multipletto (6,48 – 6,42 ppm) que correspondem aos quatro hidrogênios aromáticos (H12 a H15) do fragmento amino-arila. Houve também a presença de um sinal em 4,02 ppm que representa os dois hidrogênios (H17) do metileno ligado ao oxigênio do fragmento amino-arila e outro tripleto em 2,70 ppm que representam os outros dois hidrogênios (H18) do metileno ligado ao nitrogênio do mesmo fragmento. Entre 3,26 e 3,13 ppm observa-se dois multipletto que corresponde aos oito hidrogênios (H7 a H10) da piperazina e em 2,32 ppm ocorreu um sinal simpleto que relativo aos seis hidrogênios (H19 e H20) das metilas.

Na figura 11 é mostrado o espectro de RMN ^{13}C do composto **4a**. Nesse foi possível observar quatro sinais entre 160,03 e 134,27 ppm correspondentes aos carbonos quaternários; em 129,61 e 129,36 foram observados quatro sinais intensos que representam os quatro carbonos aromáticos do fragmento benzenossulfonila; em 130,04 ppm foi observado o sinal do carbono mais desblindado (C14) do fragmento amino-arila; entre 109,81 e 104,40 ppm apresentaram os sinais dos carbonos C13, C15 e C12 do fragmento amino-arila; em 66,02 e 58,49 ppm ocorreu o sinais dos metilenos do fragmento amino-arila; e em 46,01 ppm observa-se um sinal intenso que representa as metilas do mesmo fragmento. Em 46,10 e 46,01 ppm ocorreu dois sinais intensos que correspondem aos quatro carbonos da piperazina. Os dados de RMN estão dispostos na tabela 1. Os demais espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos sintetizados nesse tópico estão em anexo.

Figura 10 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **4a**.

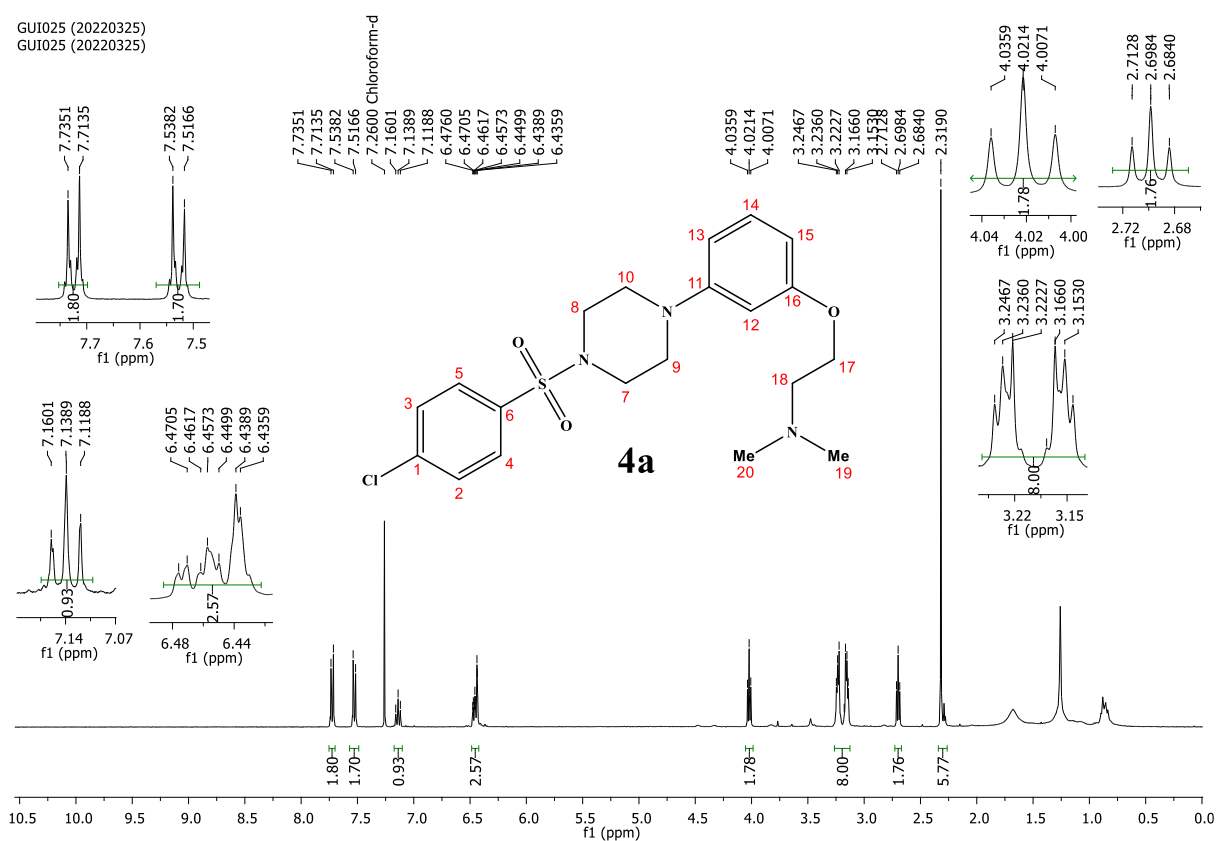
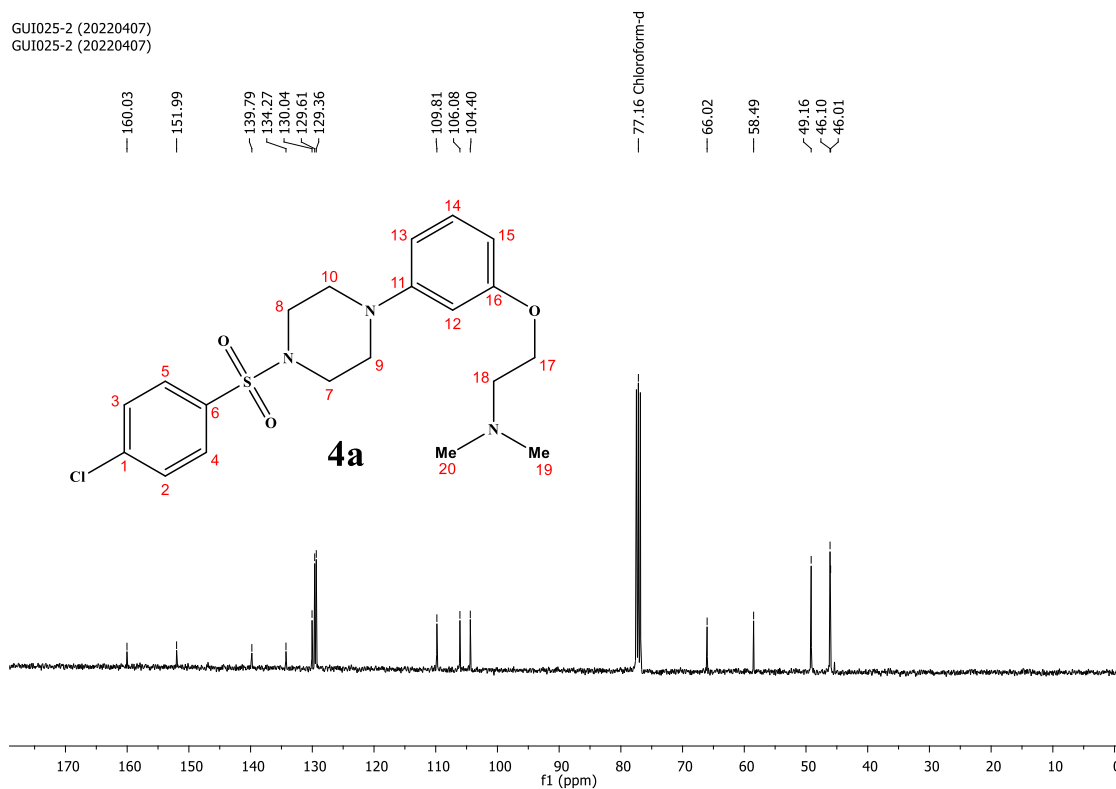


Figura 11 - Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **4a**

Fonte: Autor

Tabela 1 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **4a** (CDCl_3)

Posição H	δ_{H}^a (m^b , J^c)	Posição C	δ_{C}^a (m^b)
H4 e H5	7,72 (d, 8,7)	C6	160,03
H2 e H3	7,53 (d, 8,7)	C1	151,99
H14	7.14 (t, $J = 8,2$)	C16	139,79
H12, H13 e H15	6,48 – 6.42 (m)	C11	134,27
H17	4,02 (t, 5,8)	C14	130,04
H7, H8, H9 e H10	3,26 – 3,13 (m)	C4 e C5	129,61
H18	2,70 (t, 5,8)	C2 e C3	129,36
H19 e H20	2.32 (s)	C13	109,81
-	-	C15	106,08
-	-	C12	104,40
-	-	C17	66,02
-	-	C18	58,49
-	-	C9 e C10	49,16
-	-	C7 e C8	46,10
-	-	C19 e C20	46,01

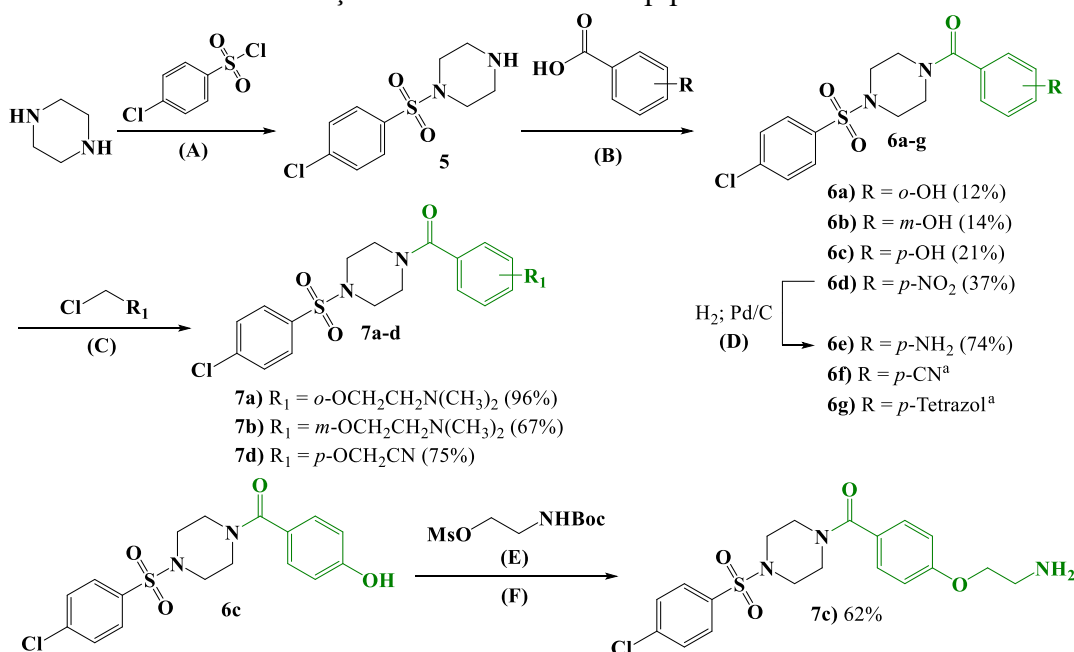
^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno^b multiplicidade^c constantes de acoplamento em Hz

Hercos, G. F. L.

3.2.1 - Síntese das modificações do fragmento amino-arila com a adição da carbonila entre a piperazina e o anel aromático

Realizadas as sínteses dos derivados **4a** e **4b**, modificando assim uma das posições do anel aromático e o grupo funcional presente nesse anel do fragmento amino-arila do hit, iniciou-se as modificações do fragmento mencionado com a adição da carbonila entre a piperazina e o segmento arila (Figura 12). Essa síntese, teve como ponto de partida a reação de substituição nucleofílica do cloreto de *p*-cloro-benzenossulfonila por um dos átomos de nitrogênio da piperazina, utilizando trietilamina como base e diclorometano como solvente gerando a sulfonamida **5**. Na sequência foi realizada uma reação de amidação entre uma série de ácidos benzoicos substituídos e a sulfonamida **5**, usando EDC como ativador da carbonila, HOBt como catalisador e dimetilformamida como solvente, produzindo os compostos **6a-e**. Os análogos **6f** e **6g** foram sintetizados previamente pelo grupo de pesquisa. Posteriormente, os derivados **6a**, **6b** e **6c**, foram alquilados por uma série de cloretos de alquilas, produzindo assim, a série de derivados **7a-d**.

Figura 12 – Rota sintética para a obtenção dos análogos das modificações no fragmento amino-arila com a adição da carbonila entre a piperazina e o anel aromático.



Fonte: Autor

(A): DCM, Et₃N, 0 °C a t.a, 14 h, 82%. (B): EDC, HOBt, DMF, t.a, 12 – 48 h, 12 – 95%. (C): NaH 60%, DMF, 0 – 50 °C, 37 – 99%. (D): MeOH, AcOEt, t.a, 3 h, 74%. (E): NaH 60%, DMF, 60 °C, 24 h, 14%. (F): HCl 4M, AcOEt, DCM, t.a, 27 h, 62%.

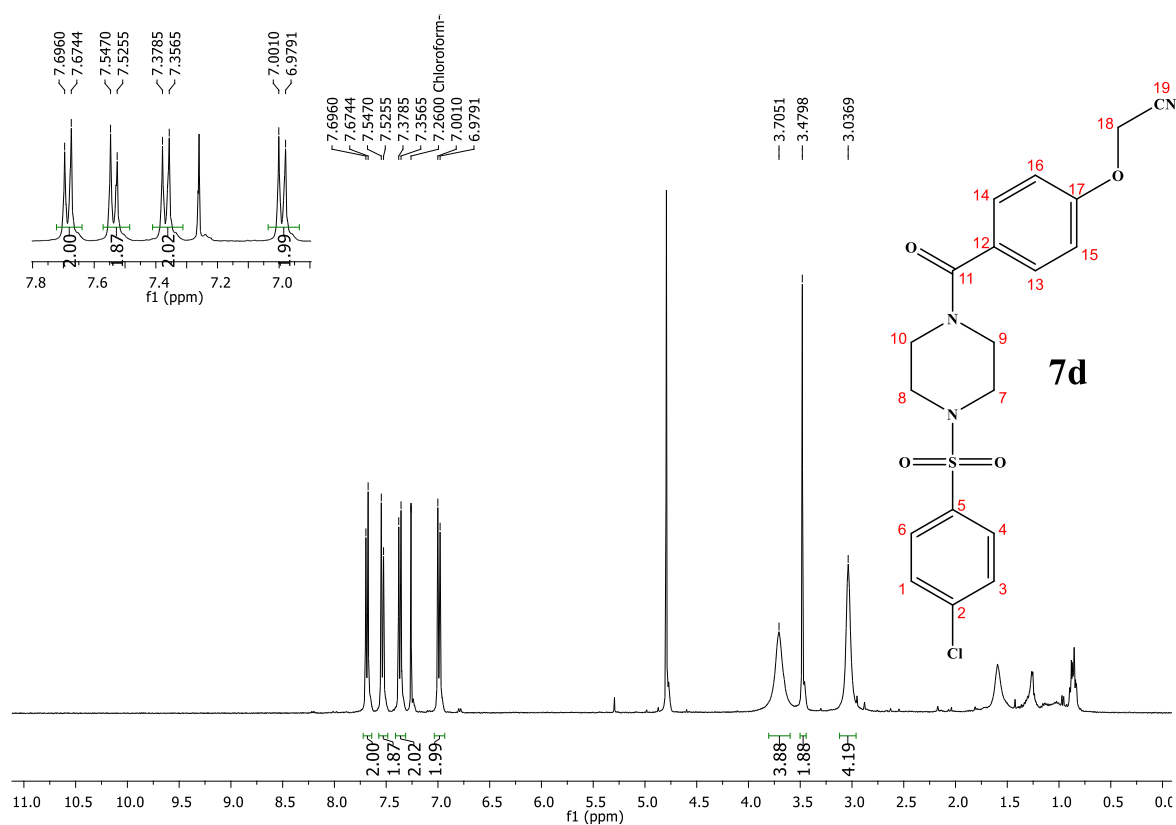
^a Composto sintetizado previamente durante o trabalho de mestrado da aluna Ana Clara Cassiano Martinho.

Os compostos **6d** e **6f** tiveram rendimentos de 37 e 75% respectivamente, sendo que esses foram preparados com o intuito de avaliar a influência dos grupos nitro e nitrila, duas funções que promovem o efeito retirador de elétrons por ressonância do anel aromático, na Hercos, G. F. L.

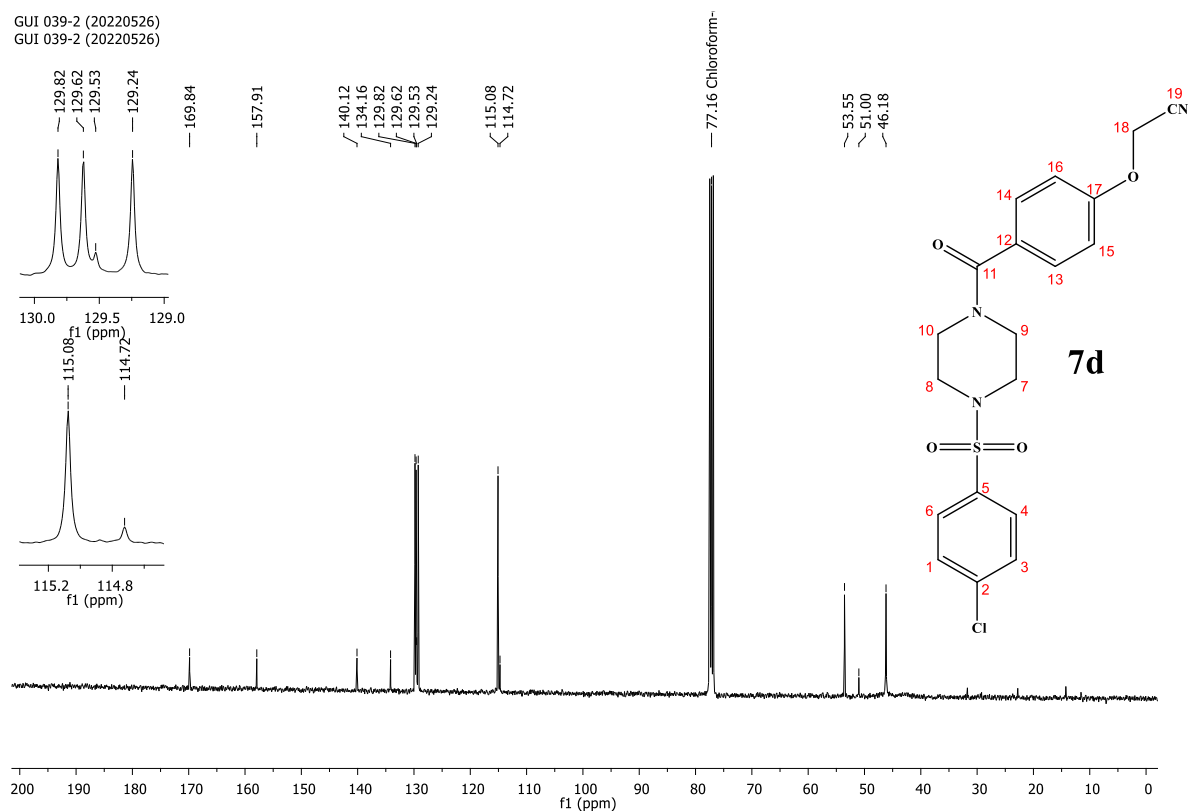
atividade biológica, bem como na citotoxicidade em células saudáveis (não infectadas). Por outro lado, o derivado **6e**, que teve um rendimento de 74%, foi sintetizado com a intenção de verificar o comportamento da atividade biológica quando se tem um grupo amina, que é um grupo funcional doador de elétrons para o anel aromático por meio do efeito de ressonância, assim como realizadora de possíveis ligações de hidrogênio com algum alvo do parasita, através do par de elétrons ligantes do nitrogênio dessa amina. Já o derivado **6g**, poderia trazer informações relevantes quanto ao comportamento da atividade tripanocida quando se tem uma classe como o tetrazol, que se caracteriza como grupo aromático, volumoso e fortemente doador de elétrons por ressonância para o anel aromático desse fragmento.

Os derivados **7a** e **7b** foram isolados com rendimentos de 96 e 67%, respectivamente, e foram sintetizados com o intuito de avaliar a importância da posição “*para*” do anel aromático do fragmento amino-arila do Hit na atividade biológica, bem como a influência das posições “*orto*” e “*meta*” desse fragmento, para atividade tripanocida e leishmanicida. Por outro lado, o derivado **7c**, que teve um rendimento de 62%, foi preparado como uma amina primária (-NH₂) com a intenção de verificar a importância das duas metilas ligadas ao nitrogênio desse fragmento para a atividade biológica. E o composto **7d**, com 75% de rendimento, foi sintetizado para a avaliação da relevância da amina terciária do hit para a atividade leishmanicida e tripanocida.

O composto **7d** foi caracterizado por RMN ¹H (Figura 12) e ¹³C (Figura 13). Foi observado no espectro de RMN ¹H, quatro dubletos referentes aos oito hidrogênios aromáticos no intervalo de 8,0 a 6,5 ppm, um singlete em 4,79 ppm referente aos dois hidrogênios do metileno oriundos da acetonitrila e dois singletos em 3,71 e 3,07 ppm referente aos quatro hidrogênios da piperazina. No espectro de RMN ¹³C, foi observado um sinal em 169,84 ppm referente ao carbono da carbonila (C11), sinais em 157,91 e 140,12 ppm correspondentes aos dois carbonos quaternários do fragmento benzenossulfonila (C5 e C2), o sinal em 134,15 ppm refere-se ao carbono quaternário ligado ao oxigênio no fragmento amino-arila (C17), sinais em 129,82 e 129,62 ppm referentes aos quatro carbonos terciários do fragmento benzenossulfonila (C4, C6 e C1, C2), sinais em 129,24 e 115,08 ppm correspondentes aos quatro carbonos terciários do fragmento amino-arila (C13 a C16), um sinal em 129,53 referente ao carbono quaternário do anel aromático do fragmento amino-arila ligado ao carbono da carbonila (C12), sinal em 114,72 ppm referente ao carbono da nitrila (C19), sinais em 53,55 e 46,18 correspondentes aos quatro carbonos da piperazina (C7 a C10) e um sinal em 51,00 ppm referente metileno ligado a nitrila (C18). Os dados de RMN estão dispostos na tabela 2.

Figura 13 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **7d**

Fonte: Autor

Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **7d**

Fonte: Autor

Tabela 2 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **7d** (CDCl_3)

Posição H	δ_{H}^a (m^b , J^c)	Posição C	δ_{C}^a (m^b)
H4 e H6	7,69 (d, 8,6)	C11	169,84
H1 e H3	7,54 (d, 8,6)	C5	157,91
H13 e H14	7,37 (d, 8,7)	C2	140,12
H15 e H16	6,99 (d, 8,7)	C17	134,15
H18	4,79 (s)	C4 e C6	129,82
H9 e H10	3,71 (s)	C1 e C3	129,62
H7 e H8	3,04 (s)	C12	129,52
-	-	C13 e C14	129,24
-	-	C15 e C16	115,08
-	-	C19	114,72
-	-	C7 e C8	53,55
-	-	C18	51,00
-	-	C9 e C10	46,18

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

Os procedimentos experimentais de todos os análogos inéditos, bem como dos intermediários apresentados nesse tópico se encontram detalhados no item 6.3 desse texto. Os espectros RMN (Espectro 1 – 23) se encontram apresentados em anexo. Em geral, apenas os compostos utilizados nos testes biológicos tiveram os espectros de RMN ^{13}C apresentados nesse trabalho. Vale salientar que devido ao grande número de compostos sintetizados nesse trabalho, optou-se pela discussão de apenas um espectro de ^1H e ^{13}C de um composto final representativo das moléculas sintetizada de cada serie.

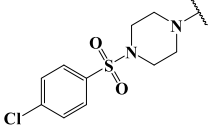
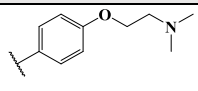
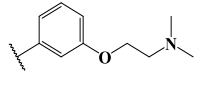
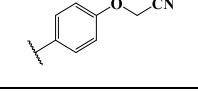
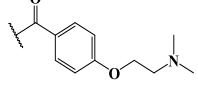
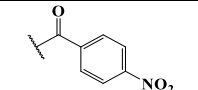
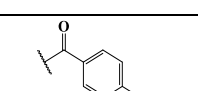
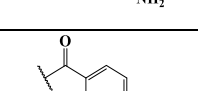
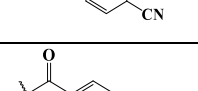
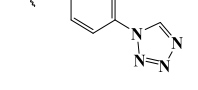
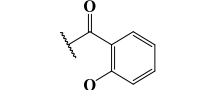
3.3 - Resultados biológicos e estudo da relação entre a estrutura química e a atividade anti- *T. cruzi* e anti – *L. infantum* das modificações no fragmento amino-arila

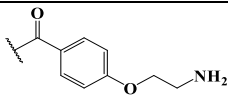
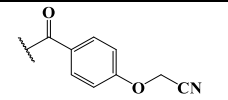
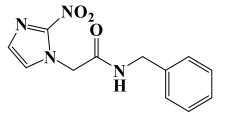
Com a obtenção dos compostos oriundos das modificações no fragmento amino-arila do hit, foi possível dar início aos ensaios biológicos, onde os análogos foram testados contra a forma tripamastigota do *T. cruzi* e promastigota da *L. infantum*. Os resultados dos derivados testados, bem como do hit e do análogo ao hit com a carbonila entre a piperazina e o anel aromático do fragmento amino-arila (**7**) são apresentados na tabela 3. Dentre os parâmetros estudados estão a concentração para inibição de 50% do alvo biológico (IC_{50}), concentração citotóxica para redução de 50% da viabilidade celular (CC_{50}) e o índice de seletividade.

A fim de estudar a relação entre a estrutura química dos derivados sintetizados e a atividade biológica obtidos pelos ensaios de potência e citotoxicidade das modificações no *Hercos*, G. F. L.

fragmento amino-arila, os compostos e os resultados biológicos agrupados na tabela 3 foram discutidos em seguida, comparando-os ao hit, ao benznidazol, que é o fármaco de referência para o tratamento da doença de Chagas; e a Anfotericina B, que é o fármaco de referência para o tratamento da Leishmaniose visceral humana.

Tabela 3 - Resultados biológicos das modificações no fragmento amino-arila

							
Código	Estrutura química	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> ¹ (μM)	CC ₅₀ L929 ² (μM)	IS <i>T. cruzi</i> ³	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> ¹ (μM)	CC ₅₀ THP1 ² (μM)	IS <i>L. infantum</i> ³
hit		3,7 ± 0,1	227	61,35	5,05 ± 0,87	1279	253,27
4a		137,4	NT [§]	-	4,59 ± 0,0	169,2	36,86
4b		7,1 ± 4,8	510	71,17	23,3 ± 0,0	51,1	2,19
7*		13,8 ± 1,3	351	25	0,90 ± 0,2	> 2212	> 2457,7
6d		> 200	NT [§]	-	48,8 ± 2,9	> 1000	> 20,49
6e		> 200	NT [§]	-	184,5 ± 0,0	> 1000	> 5,42
6f*		> 200	NT [§]	-	36,39 ± 2,2	874	24,01
6g*		145	NT [§]	-	35,93 ± 2,9	1094	30,44
7a		> 200	NT [§]	-	10,28 ± 1,1	> 500	> 48,63
7b		137,4	NT [§]	-	0,59 ± 0,4	1118	1863,33

7c		> 200	NT [‡]	-	107	910,6	8,51
7d		108,4 ± 0,0	NT [‡]	-	0,82 ± 0,4	371,3	452,80
Benznidazol (Bz)		3,81 ± 0,0	2381	625	-	-	-
Anfotericina B	-	-			0,25 ± 0,0	363,8	1455,20

¹Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário.

²Concentração do composto que induz 50% de morte celular em células não infectadas.

³CC₅₀ do composto dividido pelo IC₅₀ do composto.

*Composto sintetizado previamente durante o trabalho de mestrado da aluna Ana Clara Cassiano Martinho.

NT: Não testado.

[‡]Composto com potência baixa.

Os ensaios biológicos do **hit** contra *L. infantum* resultaram em uma atividade biológica significativa contra esse parasita (**hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 ± 0,87 μM), além de uma baixa citotoxicidade contra células saudáveis (**hit**: CC₅₀ THP1 = 253,27 μM). Uma possível explicação para que um mesmo composto tenha sido ativo contra dois parasitas diferentes, sejam as semelhanças biológicas entre a *L. infantum* e o *T. cruzi*, ambas as espécies pertencem a família *Trypanosomatidae*. Dessa forma, esses resultados são importantes pois demonstram que o hit inicialmente usado por Martinho et al (2022) contra o *T. cruzi*, também apresenta atividade leishmanicida, permitindo assim um estudo em conjunto da relação entre a estrutura química dos compostos sintetizados nesse trabalho e a atividade biológica contra dois alvos biológicos distintos (*T. cruzi* e *L. infantum*).

Os resultados biológicos obtidos do análogo **4a** contra *T. cruzi* mostraram uma acentuada perda de potência dessa molécula em relação ao **hit** (**4a**: IC₅₀ *T. cruzi* = 137,4 μM; **hit**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,7 μM). A diferença entre as estruturas químicas desses compostos, está na posição do substituinte do anel aromático do fragmento amino-arila, sendo que no hit o substituinte se localiza na posição “para” do anel benzeno, enquanto no derivado **4a**, esse está na posição “meta” do anel aromático. Comparando com o benznidazol, também houve perda de potência. Esse resultado demonstra que a posição “para” do fragmento amino-arila é essencial para atividade biológica contra o *T. cruzi*. Contudo, os resultados biológicos de **4a** contra *L. infantum* mostram que esse composto tem atividade leishmanicida, tendo uma potência equivalente à do hit (**4a**: IC₅₀ *L. infantum* = 4,59 μM; **hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 ±

0,87 μM), porém os ensaios mostram que esse composto foi mais citotóxico que o hit (**4a**: IS *L. infantum* = 36,86; **hit**: IS *L. infantum* = 253,27), demonstrando assim que tanto a posição “*para*” do hit quanto a posição “*meta*” de **4a** (ambas do fragmento amino-arila) são equipotentes contra o parasita avaliado, porém a posição “*para*” do hit foi a menos toxica para células não infectadas. Comparando com a Anfotericina B, observa-se que o fármaco de referência para a calazar foi mais ativo e menos citotóxico que o derivado **4a**.

Os ensaios biológicos do composto **4b** contra *T. cruzi* resultaram em uma potência similar ao do hit (**4b**: IC₅₀ *T. cruzi* = 7,1 μM ; **hit**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,7 μM), demonstrando assim que a amina terciária dimetilada do fragmento amino-arilado hit e o grupo nitrila do composto **4b** são interessantes para a atividade biológica. Para além desse, o teste de citotoxicidade dessa molécula, bem como o índice de seletividade, demonstrou que ela é ligeiramente menos citotóxica que o hit (**4b**: IS *T. cruzi* = 71,17; **hit**: IS *T. cruzi* = 61,35 μM). Com esse perfil, tal análogo pode seguir para futuros testes ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e a verificação da potência *in vivo*. Já os ensaios contra *L. infantum*, mostraram que a troca do grupo dimetilamina do hit pela nitrila do derivado **4b** levaram a uma perda de atividade (**4a**: IC₅₀ *L. infantum* = 23,3 μM ; **hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 \pm 0,87 μM), bem como a uma queda acentuada no índice de seletividade (**4b**: IS *L. infantum* = 2,19; **hit**: IS *L. infantum* = 253,27), levando a conclusão de que o grupo nitrila do fragmento amino-arila de **4b** não foi uma modificação adequada para atividade biológica contra *L. infantum*.

Os resultados biológicos contra *T. cruzi* dos análogos que continham a carbonila entre a piperazina e o anel aromático do fragmento amino-arila do hit, demonstraram uma grande perda de atividade tripanocida. Apenas o composto **7**, oriundo do trabalho de Martinho et al (2022) e que foi usado inicialmente para o planejamento dessas modificações, foi possível calcular a concentração inibitória média. Contudo, quando se compara a potência de **7** (IC₅₀ *T. cruzi* = 13,8 μM) com o **hit** (IC₅₀ *T. cruzi* = 3,7 μM), observa-se que o primeiro foi 3,7 vezes menos ativo, constatando assim, que a adição da carbonila entre a piperazina e o anel aromático no fragmento amino-arila não foi interessante para a atividade biológica contra o *T. cruzi*. Em contrapartida, os resultados biológicos contra *L. infantum* dos compostos que continham a carbonila entre a piperazina e o anel aromático do fragmento amino-arila do hit foram muito promissores.

Os ensaios biológicos usando o análogo **7** contra *L. infantum* apresentaram uma grande melhora na atividade biológica em relação ao hit (**7**: IC₅₀ *L. infantum* = 0,90 μM ; **hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 \pm 0,87 μM), sendo esse análogo 5,6 vezes mais ativo que a molécula protótipo.

Os resultados de citotoxicidade e índice de seletividade também foram animadores (**7**: IS *L. infantum* = >2457,7; **hit**: IS *L. infantum* = 253,27), tornando o **7** um composto mais seletivo que o hit e que o fármaco de referência (**7**: IS *L. infantum* = >2457,7; **Anfotericina B**: IS *L. infantum* = 1455,20). Com isso, a adição da carbonila entre a piperazina e o anel aromático do fragmento amino-arila melhorou a atividade leishmanicida, tornando o derivado **7** um candidato a testes ADME e a verificação da potência em ensaios *in vivo* contra *L. infantum*.

Os resultados biológicos dos análogos **6d** (onde a modificação realizada em relação ao **7** foi a troca do grupo 2-(dimetilamino)etan-1-olato ligado na posição “para” do anel aromático do fragmento amino-arila pelo grupo nitro, ligado na mesma posição), **6e** (oriundo de uma reação de redução do grupo nitro do composto **6d**, gerando assim uma amina primária), **6f** (sendo que principal mudança frente ao composto **7** foi a troca do grupo 2-(dimetilamino)etan-1-olato ligado na posição “para” do anel aromático do fragmento amino-arila pelo grupo nitrila ligado na mesma posição) e **6g** (onde se trocou o grupo 2-(dimetilamino)etan-1-olato pelo grupo tetrazol ligado na posição “para” do anel aromático) mostraram uma perda de atividade leishmanicida para ambos os derivados (IC_{50} *L. infantum* > 30 μ M) em relação ao composto **7** (IC_{50} *L. infantum* = 0,90 μ M).

Quando se analisa os resultados biológicos e as estruturas químicas dos análogos **6d**, **6e**, **6f** e **6g** comparando-os com o composto **7**, observa-se uma correlação entre uma alta atividade leishmanicida e o grupo etan-1-olato ligado ao anel aromático do fragmento amino-arila da molécula referenciada, levando a conclusão de que essa parte é de essencial manutenção para futuras modificações.

Os ensaios biológicos contra *L. infantum* dos análogos **7a** e **7b**, onde as modificações realizadas foram a troca da posição “para” do grupo 2-(dimetilamino)etan-1-olato presente no anel aromático do fragmento amino-arila do composto **7** pelas posições “orto” (composto **7a**) e “meta” (composto **7b**), mostram uma perda de potência quando o substituinte está na posição “orto” (**7a**: IC_{50} *L. infantum* = 10,28 μ M; **7**: IC_{50} *L. infantum* = 0,90 μ M), porém houve uma melhora da atividade biológica quando o grupo 2-(dimetilamino)etan-1-olato encontra-se na posição “meta” (**7b**: IC_{50} *L. infantum* = 0,59 μ M; **7**: IC_{50} *L. infantum* = 0,90 μ M). Esses resultados acabam levando a conclusão de que a posição “meta” do aril desse fragmento foi a mais ativa que a do análogo **7**, contudo outro aspecto levado em consideração foi o índice de seletividade, que está relacionado com a citotoxicidade e a atividade biológica. Nesse contexto o substituinte na posição “para” de **7** se mostrou 8,5 vezes mais seletivo, consequentemente menos citotóxico, que a posição “meta” do composto **7b**. Mesmo com essa diferença, o análogo

7b acaba sendo um candidato aos testes ADME e ensaios para averiguar a atividade biológica e citotoxicidade *in vivo*.

Os resultados biológicos contra *L. infantum* do composto **7c**, onde a modificação realizada foi a troca das duas metilas da amina terciária do fragmento amino-arila de **7** por dois hidrogênios (grupo 2-aminoetan-1-olato; **7c**), mostraram uma grande perda de atividade biológica quando se comparada a molécula de referência (**7c**: IC₅₀ *L. infantum* = 107 µM; **7**: IC₅₀ *L. infantum* = 0,90 µM). Esses dados lavam a conclusão de que a presença das duas metilas no fragmento amino-arila torna-se essencial para a manutenção da alta potência contra o *L. infantum*.

Os testes biológicos do análogo **7d** contra *L. infantum* apresentaram uma potência ligeiramente melhor que o composto **7** (**7d**: IC₅₀ *L. infantum* = 0,82 µM; **7**: IC₅₀ *L. infantum* = 0,90 µM). Do ponto de vista do índice de seletividade, **7d** se mostrou 5,4 vezes menos seletivo que o análogo em comparação. Esses resultados demonstram que o grupo nitrila tem uma atividade quase que equipotente a da amina terciária de **7**, o que faz do derivado um candidato aos testes ADME, atividade biológica e citotoxicidade *in vivo*.

Portanto, após esse estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica dos análogos apresentados nesse tópico, foi possível concluir que a estrutura química do fragmento amino-arila mais ativa contra o *T. cruzi* é aquela apresentada no **hit**. Quanto aos testes biológicos contra *L. infantum*, o análogo **7**, juntamente com os análogos **7b** e **7d** se mostram os mais ativos contra esse alvo biológico.

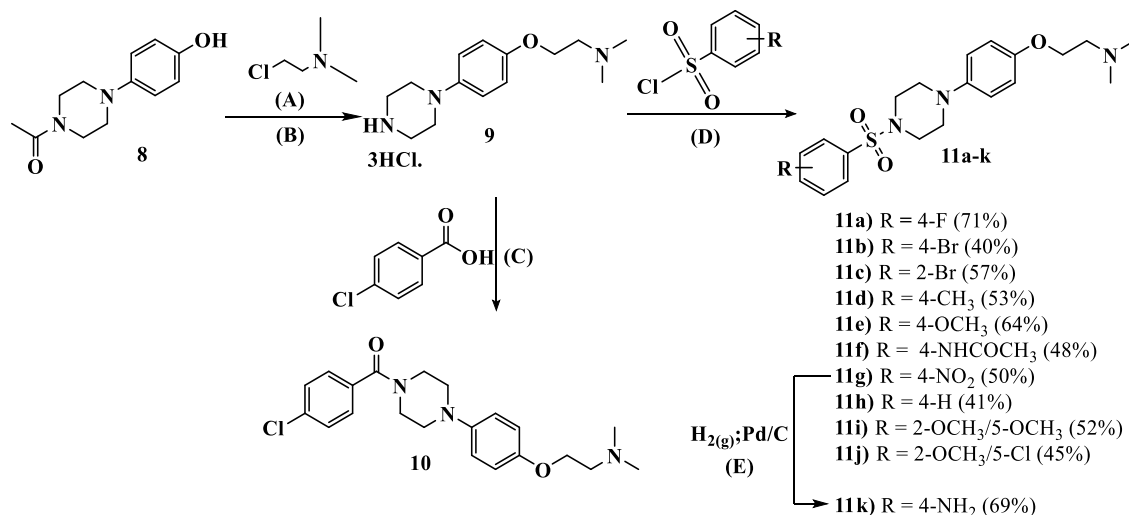
3.4 - Sínteses das modificações do fragmento benzenossulfonila do hit

Com os resultados biológicos das modificações no fragmento amino-arila do hit analisados, foram iniciadas as sínteses das modificações do fragmento benzenossulfonila (Figura 15). A rota sintética partiu da alquilação da hidroxila fenólica do composto **8** pelo cloreto de *N,N*-dimetil-etanamina, usando hidreto de sódio como base e DMF como solvente. Em seguida, foi realizada a hidrólise do grupo amida do composto **8** com uma solução de ácido clorídrico 4M à uma temperatura de 90 °C; obtendo assim, o cloridrato **9**. A rota se ramifica em duas direções, sendo que uma segue para uma reação de amidação com o ácido *para*-clorobenzoico e o cloridrato **9**, usando EDC como agente ativante da carbonila do ácido, HOBt como catalisador e Et₃N, DMF e DCM como solventes, obtendo assim o derivado **10**. A outra direção da rota sintética foi a substituição nucleofílica da sulfonila de diversos análogos de cloretos de benzenossulfonila com o cloridrato **9**, utilizando Et₃N como base e DCM e DMF como solventes; levando a obtenção da série de derivados **11a-j**. O derivado **11g** foi submetido

Hercos, G. F. L.

a uma reação de redução de grupo nitro, utilizando hidrogênio gasoso, Pd⁰ sobre carbono, acetato de etila e metanol como solventes, levando a obtenção do composto **11k**.

Figura 15 - Rota sintética para a obtenção dos análogos das modificações no fragmento benzenossulfonila.



Fonte: Autor

(A): NaH 60%, DMF, 0°C - 50°C, atm Ar, 15 h, 72%. (B): HCl, 90 °C, 3 h, 86%. (C): EDC, HOBT, DMF, Et₃N, t.a, 18 h. (D): DCM, DMF, Et₃N, 0°C – t.a. (E): MeOH, AcOEt, t.a, 2 h, 69%.

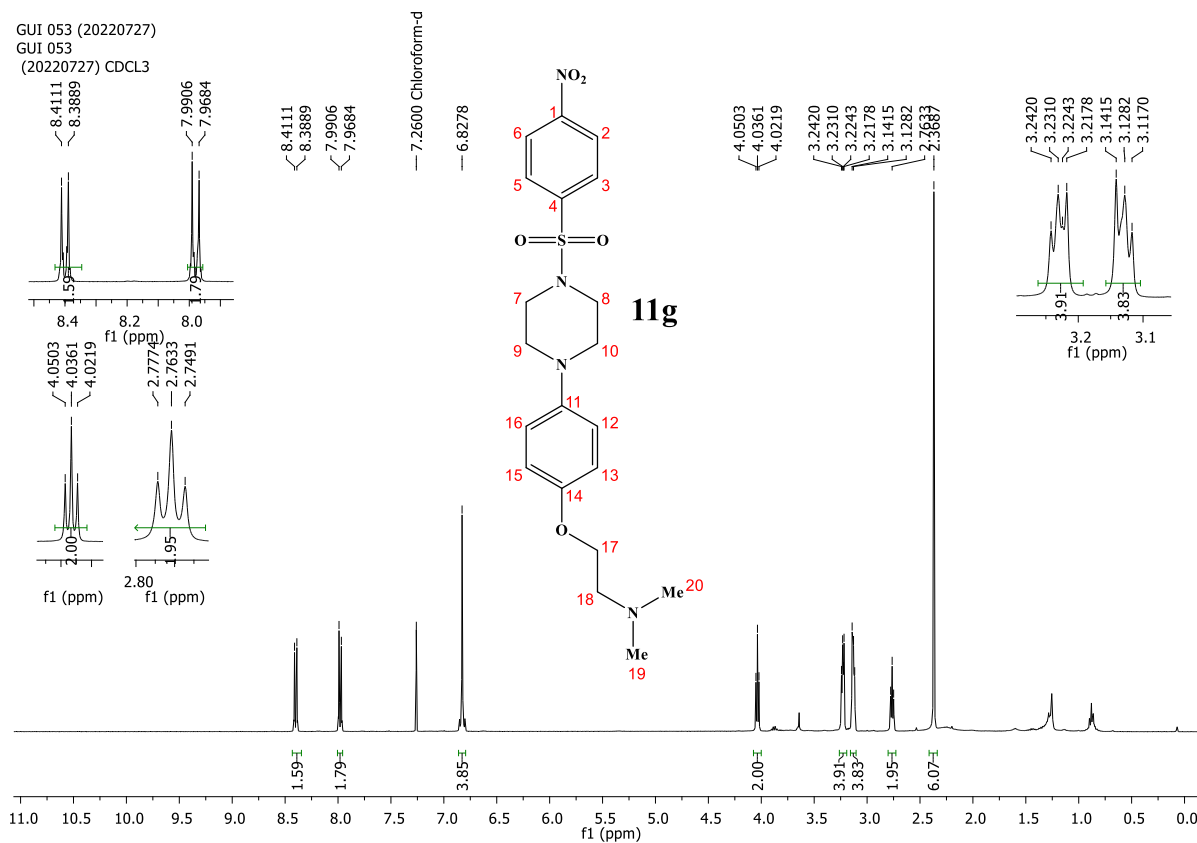
O derivado **10**, com rendimento de 74%, foi sintetizado para averiguar a importância do grupo sulfonamida do hit para a atividade biológica. Os análogos **11a** e **11b**, com 71 e 40% de rendimento, respectivamente, foram sintetizados com a intenção de avaliar o efeito que diferentes substituintes halogênicos teriam sobre a atividade biológica, bem como a importância do átomo de cloro do hit para a potência contra o *T. cruzi* e *L. infantum*. O derivado **11c**, com rendimento de 57%, foi produzido com o intuito de verificar a importância da posição “para”. Os análogos **11d**, **11e**, **11f** e **11k**, com rendimentos de 53, 64, 48 e 69% respectivamente, foram sintetizados com a intenção de verificar os efeitos de grupos doadores de elétrons por diferentes formas (a metila no composto **11d** doa elétrons por indução, enquanto a metoxila do composto **11e**, a acetamida do composto **11f** e a amina do composto **11k** doam elétrons por meio da ressonância para o anel aromático) tinham sobre a potência contra o alvo biológico. O derivado **11g**, com rendimento de 50%, foi produzido para avaliar o efeito do grupo nitro, um grupo funcional fortemente retirador de elétrons do anel aromático por meio da ressonância. O composto **11h**, com 41% de rendimento, foi sintetizado para verificar a importância de se ter um substituinte diferente do hidrogênio no anel aromático do fragmento benzenossulfonila. Os análogos **11i** e **11j**, com 52 e 45% de rendimento respectivamente, foram produzidos para avaliar os efeitos sobre a atividade biológica quando se tem dois substituintes em diferentes

posições no anel aromático (**11i**: uma metoxila na posição 2 e outra na posição 5; **11j**: uma metoxila na posição 2 e um cloro na posição 5).

O espectro de RMN de ^1H do composto **11g** (Figura 15) apresentou dois dupletos desblindados (8,40 e 7,98 ppm) que correspondem a 4 hidrogênios aromáticos do grupo benzenossulfonila, sendo que o dubleto mais deslocados (8,41 ppm) representam os dois átomos de hidrogênios ligados aos átomos de carbono próximo ao grupo nitro (H2, H3, H5 e H6). Há também a ocorrência de um simpleto em 6,83 ppm que corresponde a quatro hidrogênios (H12, H13, H15 e H16); dois tripletos, um em 4,04 ppm que correspondem aos dois hidrogênios do metileno ligado ao átomo de oxigênio (H17) e outro em 2,76 ppm que correspondem a dois hidrogênios do metileno ligado ao átomo de nitrogênio do fragmento amino-arila (H18), além de um simpleto em 2,37 ppm correspondente aos seis hidrogênios das duas metilas ligadas ao átomo de nitrogênio do mesmo fragmento (H19 e H20). Entre 3,26 e 3,11 ppm tem-se a ocorrência de dois multipletos correspondentes aos oito hidrogênios da piperazina (H7 a H10).

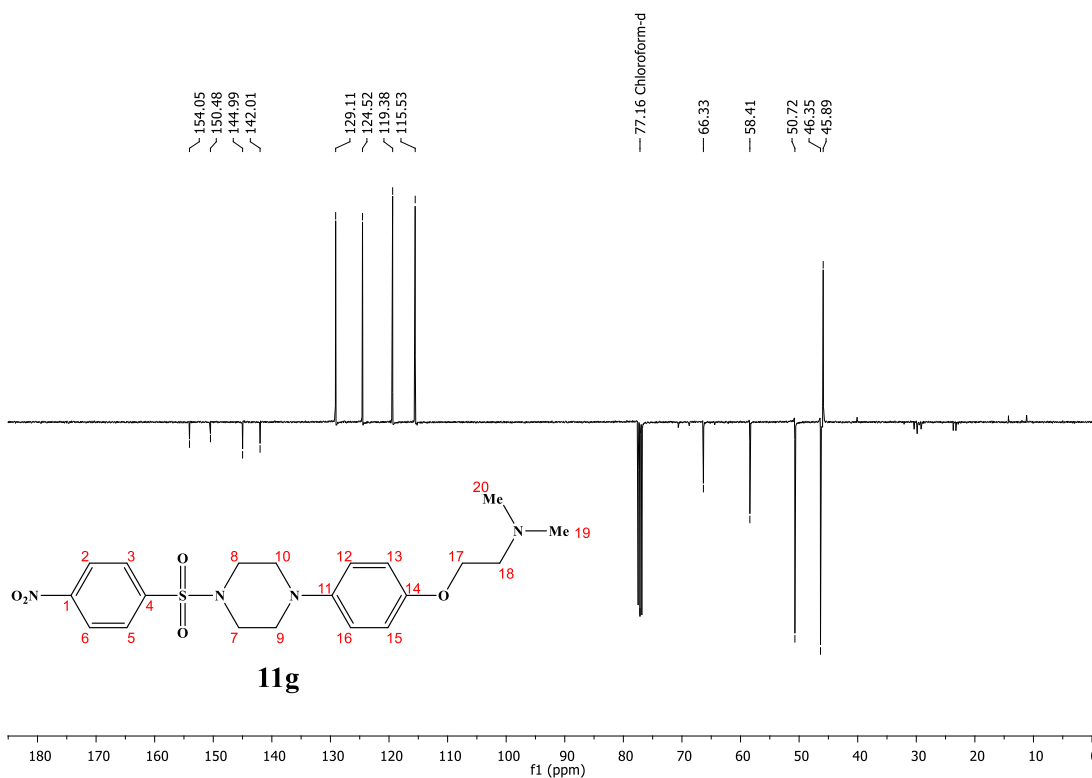
O espectro de RMN de ^{13}C do composto **11g** (Figura 16) apresentou quatro sinais entre 154,05 e 142,01 ppm correspondentes aos carbonos quaternários (C1, C4, C14 e C11), quatro sinais intensos no intervalo de 129,11 e 115,53 ppm, sendo os dois primeiros relativos aos quatro carbonos aromáticos do fragmento benzenossulfonila (C2, C3, C5 e C6) e os dois últimos sinais correspondentes aos quatro carbonos aromáticos do fragmento amino-arila (C12, C13, C14 e C15). Em 66,33 e 58,41 ppm foi observado dois sinais correspondentes aos dois carbonos dos metilenos presente no fragmento amino-arila (C17 e C18), bem como o sinal em 45,89 ppm referente os dois carbonos das metilas presentes no mesmo fragmento (C19 e C20). Em 50,72 e 46,35 ppm foi observado dois sinais correspondentes aos quatro carbonos da piperazina (C7 a C10). Os dados de RMN estão dispostos na tabela 4.

Figura 16 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **11g**.



Fonte: Autor

Figura 17 - Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **11g**.



Fonte: Autor

Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **11g** (CDCl_3).

Posição H	δ_{H}^a (m^b , J^c)	Posição C	δ_{C}^a (m^b)
H2 e H6	8,40 (d, 8,9)	C1	154,05
H3 e H5	7,98 (d, 8,9)	C4	150,48
H12, H13, H15 e H16	6,83 (s)	C14	144,99
H17	4,04 (t, 5,7)	C11	142,01
H7 e H8	3,26 – 3,20 (m)	C2 e C6	129,11
H9 e H10	3,16 – 3,11 (m)	C3 e C5	124,52
H18	2,76 (t, 5,7)	C13 e C15	119,38
H19 e H20	2,37 (s)	C12 e C16	115,53
-	-	C17	66,33
-	-	C18	58,41
-	-	C7 e C8	50,72
-	-	C9 e C10	46,35
-	-	C19 e C20	45,89

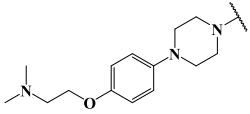
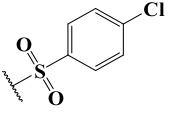
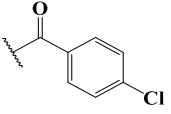
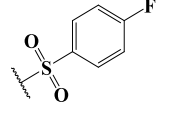
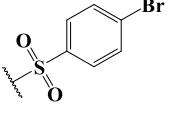
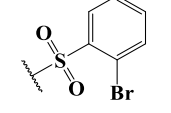
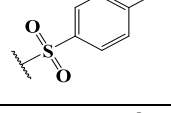
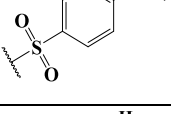
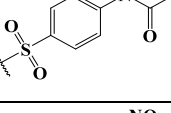
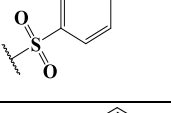
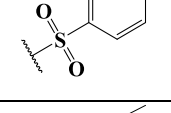
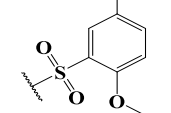
^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno^b multiplicidade^c constantes de acoplamento em Hz

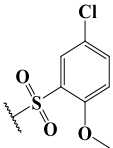
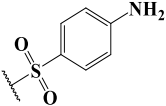
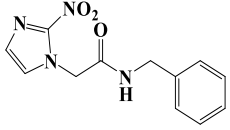
Os procedimentos experimentais de todos os análogos inéditos, bem como dos intermediários apresentados nesse tópico se encontram detalhados no item 6.3 desse texto. Os demais espectros de RMN dos compostos apresentados nesse tópico se encontram em anexo (Espectro 24 – 49).

3.5 - Resultados biológicos e estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica das modificações no fragmento benzenossulfonila contra *T. cruzi* e *L. infantum*.

Com as sínteses dos análogos oriundos das modificações no fragmento benzenossulfonila concluídas, essas substâncias foram enviadas para testes de potência contra o *T. cruzi* e *L. infantum*; além da citotoxicidade em células saudáveis. Os resultados biológicos estão dispostos na tabela 5. Logo em seguida, foi realizado um estudo da relação entre a estrutura química e atividade biológica dessa série de derivados comparando-os ao hit, ao benznidazol, fármaco de referência para *T. cruzi*; e a anfotericina B, controle positivo contra *L. infantum*.

Tabela 5 - Resultados biológicos das modificações no fragmento benzenossulfonila

							
Código	Estrutura química	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> ¹ (μM)	CC ₅₀ L929 ² (μM)	IS <i>T. cruzi</i> ³	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> ¹ (μM)	CC ₅₀ THP1 ² (μM)	IS <i>L. infantum</i> ³
Hit		3,7 ± 0,1	227	61,35	5,05 ± 0,87	1279	253,2
10		4,30 ± 0,67	338,59	79	37,5 ± 2,2	1891	50,4
11a		6,38 ± 0,32	373,93	58,51	6,06 ± 1,69	>2453	404,7
11b		8,28 ± 4,27	> 426,99	> 52	106,3	283,1	2,6
11c		3,65 ± 0,19	10,01	3	43,3 ± 3,6	160,6	3,7
11d		2,21 ± 0,18	289,24	135	190,6	288,6	1,5
11e		7,08 ± 1,99	354,26	50	25,1 ± 0,1	387,7	15,4
11f		186,76	NT*	-	108,9	1432,5	13
11g		1,70 ± 0,09	301,47	177	62,9 ± 3,3	342,5	5,4
11h		27,98 ± 1,02	91,22	3	116,2	649,9	5,5
11i		13,37 ± 0,45	273,5	21	29,6 ± 1,9	141,1	4,7

11j		12,56 ± 1,54	148,3	12	154,4	73,9	2,0
11k		167,87	NT*	-	55,19 ± 4,6	Não testado	-
Benznidazol (Bz)		3,81	2381	625	-	-	-
Anfotericina B		-	-	-	0,25	363,8	1455,20

¹Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário.

²Concentração do composto que induz 50% de morte celular em células não infectadas.

³CC₅₀ do composto dividido pelo IC₅₀ do composto.

*Composto com baixa atividade biológica contra o *T. cruzi*

Os resultados biológicos contra o *T. cruzi* do composto **10**, o qual a modificação realizada foi a troca do grupo sulfonila por uma carbonila, revelam uma potência equivalente ao do **hit** (**10**: IC₅₀ *T. cruzi* = 4,30 ± 0,67 µM; **hit**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,7 ± 0,1 µM), porém o resultado de citotoxicidade mostrou uma melhora no índice de seletividade (**10**: IS = 79; **hit**: IS = 61,35). Comparando o benznidazol (**Bz**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,81 µM) com o análogo **10**, esse teve uma potência equivalente ao do fármaco de referência. Esses resultados, tornam essa molécula viável para futuros testes ADME e de potência contra o *T. cruzi in vivo*, bem como o planejamento de novas modificações no fragmento benzenossulfonila. Contudo, os resultados biológicos contra *L. infantum* do composto **10** mostraram uma perda de atividade em relação ao **hit** (**10**: IC₅₀ *L. infantum* = 37,5 µM; **hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 ± 0,87 µM), assim como uma redução no índice de seletividade, sendo que o derivado **10** foi 5 vezes menos seletivo que o **hit**, revelando que a modificação realizada contribui negativamente para o combate do parasita *L. infantum*.

Os ensaios biológicos contra *T. cruzi* dos análogos **11a** e **11b** mostraram uma pequena perda de atividade tripanocida em relação ao **hit** (**11a**: IC₅₀ *T. cruzi* = 6,38 µM; **11b**: IC₅₀ *T. cruzi* = 8,28 µM; **hit**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,7 µM). Esses resultados evidenciam que nesse comparativo, o cloro é o halogênio ideal para posição “para” do anel aromático em relação a sulfonamida e que tanto o aumento da eletronegatividade promovida pelo flúor no composto **11a**, como a redução da eletronegatividade causada pelo bromo na molécula **11b**, levaram a uma perda de potência e a uma redução no índice de seletividade em relação ao **hit** (**11a**: IS = 58; **11b**: IS > 52; **hit**: IS = 61). Contudo, ambas as moléculas devem seguir para testes ADME *Hercos, G. F. L.*

e teste de potência contra o *T. cruzi* *in vivo*. Já os resultados biológicos contra *L. infantum* demonstraram que **11a** foi equipotente ao **hit** (**11a**: IC₅₀ *L. infantum* = 6,06 ± 1,69 µM; **hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 ± 0,87 µM) e 1,5 vezes mais seletivo que a molécula protótipo, enquanto **11b** apresentou uma grande queda tanto na seletividade quanto na potência (**11b**: IS *L. infantum* = 2,6, IC₅₀ *L. infantum* 106,3 µM; **hit**: IS *L. infantum* = 253,2, IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 ± 0,87 µM) demonstrando que um halogênio mais eletronegativo na posição “*para*” do anel aromático do fragmento benzenossulfonila contribui para o aumento da atividade leishmanicida.

Os resultados biológicos do derivado **11c** mostraram uma atividade biológica contra o *T. cruzi* equiparável ao **hit** (**11c**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,65 µM; **hit**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,7 µM), porém a troca do halogênio (Cl do **hit** para Br no **11c**), bem como a mudança da posição “*para*” do anel aromático desse fragmento para a posição “*orto*”, levaram a uma redução drástica do índice de seletividade de **11c** em relação ao protótipo (**11c**: IS > 3; **hit**: IS = 61), o que significa que esse análogo foi tóxico para células saudáveis e que essa posição do anel aromático talvez não seja a mais recomendada. Contudo, os ensaios biológicos contra *L. infantum* mostram uma redução de atividade biológico de **11c** em relação ao **hit** (**11c**: IC₅₀ *L. infantum* = 43,3 µM; **hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 ± 0,87 µM), assim como uma acentuada perda de seletividade, demonstrando assim que a nem a posição “*orto*” do anel aromático do fragmento benzenossulfonila e nem o substituinte bromo são adequados para a atividade leishmanicida.

Os ensaios biológicos contra *T. cruzi* do análogo **11d**, que teve como modificação a troca do substituinte cloro do protótipo por uma metila, demonstraram um ganho de potência contra o *T. cruzi* em relação ao **hit** (**11d**: IC₅₀ *T. cruzi* = 2,21 µM; **hit**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,7 µM), assim como um grande aumento do índice de seletividade (**11d**: IS > 135; **hit**: IS = 61). Uma possível justificativa para essa diferenciação pode estar na natureza doadora de elétrons para o anel benzeno por indução do substituinte metila do composto **11d**. Bem como o fato dessa metila ser um grupo mais apolar em relação ao cloro, podendo assim realizar interações de Van der Waals com uma região apolar de alguma enzima do parasita. Comparando o benznidazol (**Bz**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,81 µM) com o análogo **11d**, esse teve uma potência equivalente ao fármaco de referência. E dessa forma, o análogo **11d** se torna um excelente candidato para os testes biológicos de ADME e potência contra o *T. cruzi* *in vivo*. Em contrapartida, os resultados biológicos contra *L. infantum* mostraram que a troca do grupo cloro (**hit**) pela metila (**11d**) promoveu uma grande perda de potência (**11d**: IC₅₀ *L. infantum* = 190,6 µM; **hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 ± 0,87 µM), assim como uma redução drástica do índice de seletividade (**11d**

foi 168 vezes menos seletivo que o **hit**), lavando a conclusão de que essa modificação não é adequada para combate ao *L. infantum*.

Os resultados biológicos contra *T. cruzi* dos compostos **11e**, **11f** e **11k**, que compartilham o fato de que os substituintes na posição “*para*” são todos doadores de elétrons para o anel benzeno por meio do efeito de ressonância, apresentaram uma perda de potência em relação ao **hit** (**11e**: $IC_{50} T. cruzi = 7,08 \mu M$; **11f**: $IC_{50} T. cruzi = 186,76 \mu M$; **11k**: $IC_{50} T. cruzi = 167,87 \mu M$; **hit**: $IC_{50} T. cruzi = 3,7 \mu M$). Porém, a perda de potência foi mais acentuada nos derivados **11f**, que tem o substituinte acetamida; e **11k**, com uma amina. A diferença dessas duas moléculas com o **11e** está na disponibilidade do par de elétrons de seus substituintes, já que o último tem uma metoxila na posição “*para*” do anel benzeno e essa por ser mais eletronegativa que a amida e a amina dos compostos **11f** e **11k** respectivamente, doa elétrons com menos intensidade que os grupos nitrogenados, residindo nesse aspecto, uma justificativa para grande diferença de potência entre derivados com nitrogênio e o derivado oxigenado. O mesmo padrão apresentado nos testes contra *T. cruzi* pode ser observado os resultados biológicos contra *L. infantum* (**11e**: $IC_{50} L. infantum = 25,1 \mu M$; **11f**: $IC_{50} L. infantum = 108,9 \mu M$; **11k**: $IC_{50} L. infantum = 55,19 \mu M$; **hit**: $IC_{50} L. infantum = 5,05 \pm 0,87 \mu M$), sendo o derivado que contém a metoxila (**11e**; grupo oxigenado) foi mais ativo que os análogos que contém a acetamida e a amina primária (**11f** e **11k** respectivamente; grupos nitrogenados).

Os ensaios biológicos do análogo **11g** contra *T. cruzi* apresentaram um aumento, tanto da potência quanto do índice de seletividade, quando comparado ao **hit** (**11g**: $IC_{50} T. cruzi = 1,70 \mu M$, $IS = 177$; **hit**: $IC_{50} T. cruzi = 3,7 \mu M$, $IS = 61$). A diferença de potência pode ser justificada pela natureza do substituinte do análogo em comparação ao substituinte do protótipo, já que o composto **11g** detém de um grupo nitro, que é um retirador de elétrons mais forte que o substituinte cloro no **hit**. Além disso, o grupo nitro está presente também no benznidazol e devido à grande potência que os ensaios biológicos do derivado **11g** apresentaram, pode ser um indicativo de que o mecanismo de ação biológico desse “nitro-composto” seja similar ao do fármaco de referência, como demonstrado no item 1.1.3. Sendo assim, um grupo retirador de elétrons por ressonância é mais ativo biologicamente contra o *T. cruzi* que um grupo retirador de elétrons por indução, sendo o derivado **11g**, um promissor candidato a fármaco, que será testado para verificar a potência contra o *T. cruzi* *in vivo* e testes ADME. Porém, a mesma conclusão não se repete para os resultados biológicos contra *L. infantum*, sendo que o análogo **11g** teve uma perda de atividade biológica em relação ao **hit** (**11g**: $IC_{50} L. infantum = 62,9 \mu M$; **hit**: $IC_{50} L. infantum = 5,05 \pm 0,87 \mu M$), assim como uma alta redução do índice de seletividade

(11g foi 48 vezes menos seletivo que o **hit**), demonstrando que o grupo nitro não foi adequado para o combate a *L. infantum*.

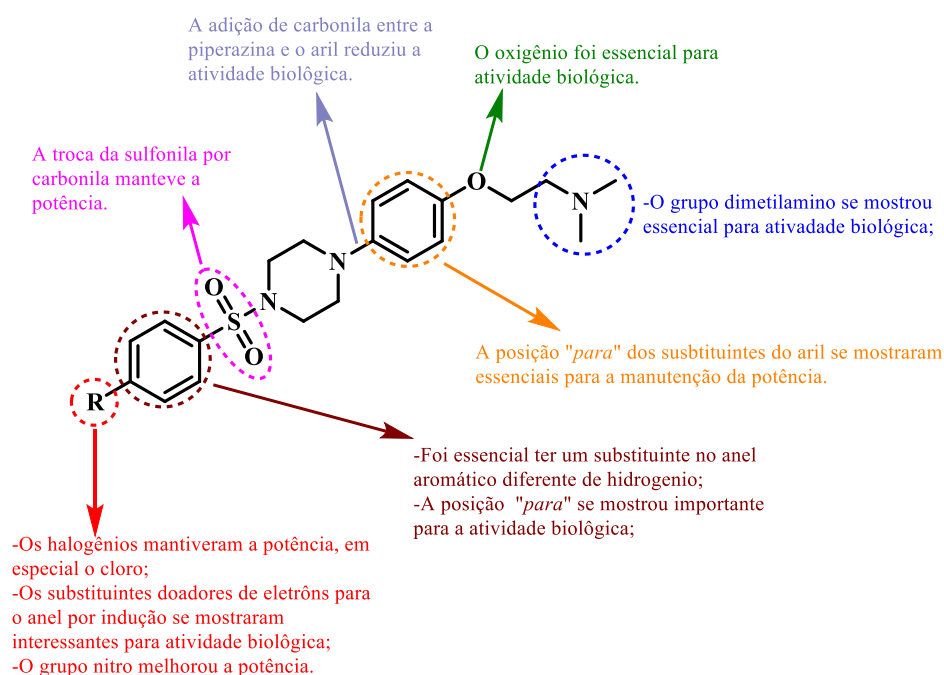
Os resultados dos ensaios biológicos contra *T. cruzi* do composto **11h**, evidenciaram a importância de se ter um substituinte diferente de hidrogênio no anel aromático do fragmento benzenossulfonila, pois quando comparado ao **hit**, observa-se que o análogo **11h** foi 7,2 vezes menos potente e 20 vezes mais citotóxico que o protótipo. Logo, é necessário ter substituintes nesse anel aromático para manter a atividade biológica contra o *T. cruzi*. A mesma conclusão foi obtida dos resultados biológicos contra *L. infantum*, sendo que o derivado **11h** foi 23 vezes menos ativo e 46 vezes menos seletivo que o **hit**.

Os análogos **11i** e **11j**, tiveram resultados biológicos que mostraram uma perda de potência em relação ao **hit**, porém são equipotentes entre si (**11i**: IC₅₀ *T. cruzi* = 13,37 µM; **11j**: IC₅₀ *T. cruzi* = 12,56 µM; **hit**: IC₅₀ *T. cruzi* = 3,7 µM). Esses dois derivados compartilham fato de ter o anel aromático do fragmento benzenossulfonila substituídos nas posições 2 e 5 em relação a sulfonamida. O composto **11i** tem metoxilas nas posições 2 e 5 do anel benzeno; e o derivado **11j** tem uma metoxila na posição 2 e um cloro na posição 5 do anel aromático. Quando comparado o resultado de citotoxicidade desses análogos, observa-se que o **11i** é mais seletivo que o **11j**, porém ambos são mais tóxicos se comparados ao **hit** (**11i**: IS = 21; **11j**: IS = 12; **hit**: IS = 61). Isso evidencia que não é interessante para a atividade tripanocida que se tenha dois substituintes no anel aromático desse fragmento. Já os resultados biológicos contra *L. infantum* mostraram que o análogo **11i** foi o mais ativo que o **11j**, porém ambos demonstraram uma perda de atividade biológica quando comparados ao **hit** (**11i**: IC₅₀ *L. infantum* = 154,4 µM; **11j**: IC₅₀ *L. infantum* = 55,19 µM; **hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 ± 0,87 µM), demonstrando que não foi interessante para o combate a *L. infantum* a presença de dois substituintes no anel aromáticos do fragmento benzenossulfonila.

Portanto, após esse estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica dos análogos apresentados nesse tópico, foi possível concluir que a estrutura química do fragmento benzenossulfonila mais ativa contra o *T. cruzi* foi aquela apresentada no derivado **11g**. Em relação os resultados contra *L. infantum*, o **hit** e o análogo **11a** foram os mais ativos contra esse parasita.

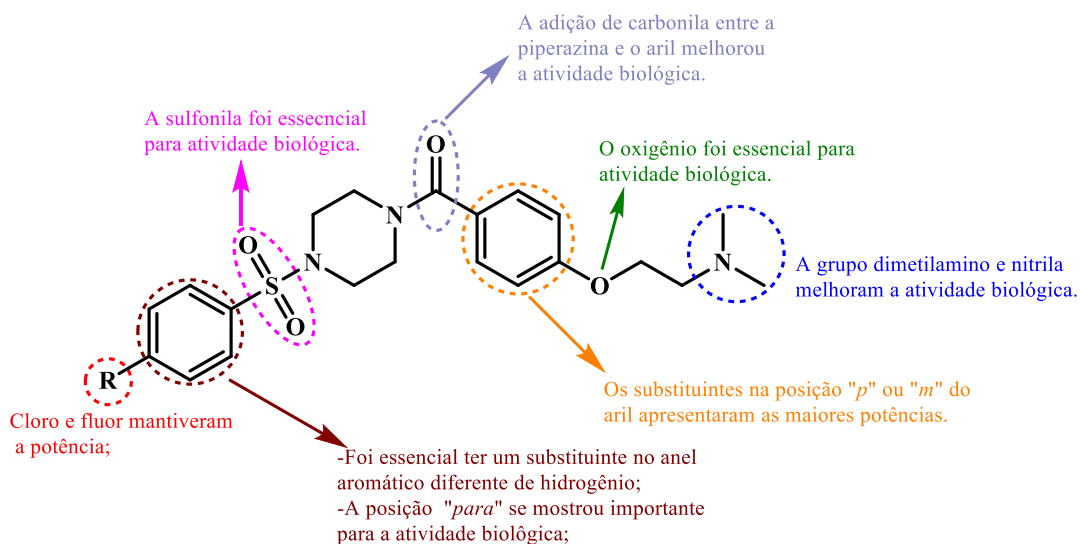
Nas figuras 18 e 19 são apresentadas as principais conclusões obtidas pelo estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica contra o *T. cruzi* (figura 18) e o *L. infantum* (figura 19).

Figura 18 – Conclusões obtidas pelo estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica contra o *T. cruzi*.



Fonte: autor

Figura 19 – Conclusões obtidas pelo estudo da relação entre a estrutura química e a atividade biológica contra o *L. infantum*.



Fonte: autor

4 - Conclusões

Nesse trabalho foi apresentado o planejamento de modificações nos fragmentos amino-arila e benzenossulfonila de um hit potente contra o *T. cruzi* e a *L. infantum*, bem como as sínteses e os resultados biológicos de 23 análogos. Partindo de uma análise retrossintética do **hit**, bem como dos resultados obtidos por Martinho et al (2022), estabeleceu-se que seria realizado modificações nos fragmentos amino-aria e benzenossulfonila desse **hit**.

Nas modificações no fragmento amino-arila foram obtidos 10 análogos inéditos, sendo que os derivados **4a** e **4b** foram sintetizados partindo de uma reação de substituição nucleofílica do cloreto de 4-clorobenzenossulfonila pelas aminas **1a-b**, seguido das alquilações dos fenóis **2a-b** pelos cloretos de alquila **3a-b**, gerando os análogos **4a-b**. Os derivados **6d-g** foram sintetizados partindo da substituição nucleofílica do cloreto de 4-clorobenzenossulfonila por um dos átomos de nitrogênio da piperazina gerando o composto **5**, em seguida foi realizado um serie de amidações utilizando diversos ácidos benzílicos substituídos. Os derivados **7a-d** foram produzidos a partir das alquilações de 3 cloretos de aquilas e um mesilato de alquila.

Dos derivados das modificações do fragmento amino-arila, o composto mais potente contra o *T. cruzi* foi **4b** (IC₅₀ *T. cruzi* = 7,1 ± 4,8 µM; CC₅₀ L929 = 510; IS = 71,17), os análogos com a carbonila entre a piperazina e o anel aromático do fragmento amino-arila apresentaram uma acentuada perca de potência em relação ao **hit**. Contudo, os ensaios biológicos contra *L. infantum* mostraram que a adição da carbonila melhorou a atividade leishmanicida da classe de derivados analisados, sendo que o **hit** e o **4a** apresentaram potências equipotentes (**hit**: IC₅₀ *L. infantum* = 5,05 ± 0,87 µM; CC₅₀ THP1 = 1279 µM; IS = 253,27; **4a**: IC₅₀ *L. infantum* = 4,59 µM; CC₅₀ THP1 = 169,2 µM; IS = 36,86) e os análogos **7b**, **7d** e **7** foram, respectivamente, os mais ativos contra *L. infantum* (**7b**: IC₅₀ *L. infantum* = 0,59 µM; CC₅₀ THP1 = 169,2 µM; IS = 286,77; **7d**: IC₅₀ *L. infantum* = 0,82 µM; CC₅₀ THP1 = 371,30 µM; IS = 452,80 e **7**: IC₅₀ *L. infantum* = 0,90 µM; CC₅₀ THP1 > 2212 µM; IS > 2457,7).

Nas modificações no fragmento benzenossulfonila foram produzidos 12 análogos inéditos, sendo que o derivado **10** foi sintetizado a partir de uma amidação da amina **9** com o ácido 4-clorobenzoico. Os derivados **11a-j** foram sintetizados a partir de substituição nucleofílica utilizando a amina **9** e uma série de cloretos de benzenossulfonila substituídos. O derivado **11k** foi sintetizado a partir da redução do grupo nitro do derivado **11g**. Dessa série de modificações do fragmento benzenossulfonila os compostos mais potentes contra *T. cruzi* foi o **10** (IC₅₀ *T. cruzi* = 4,30 ± 0,67 µM; CC₅₀ *T. cruzi* = 338,59; IS = 79), o **11d** (IC₅₀ *T. cruzi* = 2,21 ± 0,18 µM; CC₅₀ *T. cruzi* = 289,24; IS = 135) e **11g** (IC₅₀ *T. cruzi* = 1,70 ± 0,09 µM; CC₅₀ *T.*

cruzi = 301,47; IS = 177). Contra *L. infantum*, o composto mais ativo dessa série de modificações foi o **11a** (IC_{50} *L. infantum* = $6,06 \pm 1,69$ μ M; CC_{50} THP1 > 2453 μ M; IS = 404,7).

A partir desses resultados foi possível realizar estudos da relação entre a estrutura química e a atividade biológica desses derivados, levando a conclusão que a estrutura química mais ativa do fragmento amino-arila foi aquela apresentada no hit, assim como a adição da carbonila entre a piperazina e o anel aromático do fragmento amino-arila, lavaram a uma perda de potência contra o *T. cruzi*. Em contrapartida, a adição da carbonila no fragmento em questão, levaram a uma melhora na atividade leishmanicida.

No fragmento benzenossulfonila foi possível concluir que a estrutura química mais ativa contra o *T. cruzi* foi a apresentada no análogo **14g**. Já contra a *L. infantum*, o composto mais ativo foi aquela apresentada no derivado **11a**, onde foi realizada a troca do grupo cloro pelo flúor. Dessa forma, o presente trabalho buscou contribuir para a descoberta de um candidato a fármaco potente contra *T. cruzi* e menos citotóxico.

5 - Perspectivas

- Os próximos passos do projeto constem no planejamento e a síntese das modificações no fragmento piperazina do hit, bem como o envio desses futuros compostos para ensaios biológicos de potência contra o *T. cruzi* e citotoxicidade *in vitro*;
- Enviar os melhores análogos sintetizados para testes ADME;
- Enviar os melhores análogos sintetizados para ensaios biológicos contra *T. cruzi* e citotoxicidade *in vivo*;
- Caracterizar os análogos sintetizados por espectrometria de massas de alta resolução.

6 - Métodos e Materiais

6.1 - Reagentes e Solventes

Os reagentes disponíveis comercialmente foram utilizados sem purificação prévia. Trietilamina (Et_3N), dimetilformamida (DMF) e tetraidrofurano (THF) foram secos em peneira molecular. Diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e hexano (Hex) foram destilados antes do uso.

6.2 - Métodos Cromatográficos

Cromatografia de adsorção em coluna (cromatografia flash) foi realizada utilizando sílica-gel Aldrich (35-70 mesh). Os eluentes empregados estão descritos nas respectivas preparações. Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando placas obtidas a partir de

cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica-gel 60 F254 (Sigma Aldrich). A visualização se deu através de luz ultravioleta (254 nm) e atmosfera de iodo.

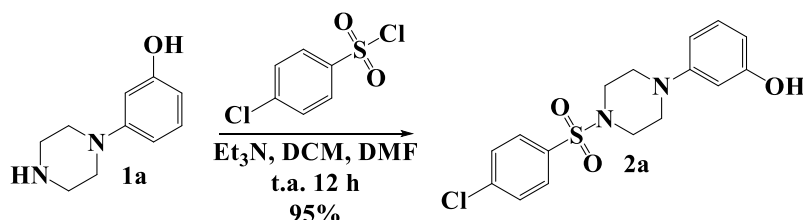
6.3 - Método analítico

6.3.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono 13 (RMN de ^{13}C) foram obtidos no aparelho Bruker Ascend 400 (400 MHz para RMN de ^1H e 101 MHz para RMN de ^{13}C) do Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da UFU. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) tendo como referência interna, resíduos de solvente não deuterado: clorofórmio (7,25 ppm para RMN de ^1H ; 77,0 ppm para RMN de ^{13}C), metanol (3,30 ppm para RMN de ^1H e 49,0 ppm para RMN de ^{13}C), dimetilsulfóxido (2,50 ppm para RMN de ^1H ; 39,5 ppm para RMN de ^{13}C) e tetrametilsilano (0,00 ppm para RMN de ^1H). Os valores das constantes de acoplamento foram medidos diretamente nos espectros de RMN de ^1H utilizando o programa MestReNova, versão 12.

6.4 - Procedimento experimental (sínteses)

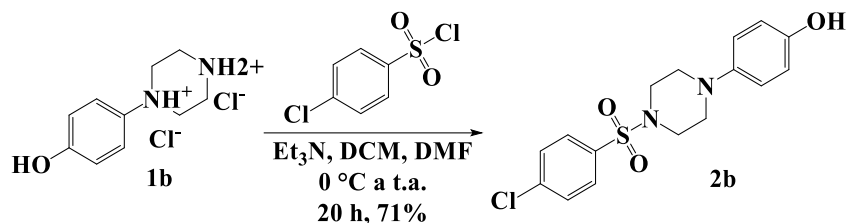
Síntese de 2a



Em um balão, adicionou-se cloreto 4-clorobenzenosulfonila (252,7 mg; 1,2 mmol) à uma mistura a 0 °C contendo **1a** (300 mg; 1,2 mmol), 17 mL de DCM, 13 mL de DMF e 7,5 mL de Et₃N. A reação foi agitada a temperatura ambiente durante 20 horas, sendo acompanhada por CCD (1Hex:1AcOEt). Posteriormente, os solventes foram evaporados, adicionou-se água destilada, o sólido formado foi filtrado e seco sob pressão reduzida. Massa obtida: 302 mg. Rendimento de 71%.

(2a) ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.15 (s, 1H), 7.78 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.76 – 7.72 (m, 2H), 6.96 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.33 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 6.27 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 6.23 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 3.16 – 3.12 (m, 4H), 3.04 – 2.99 (m, 4H).

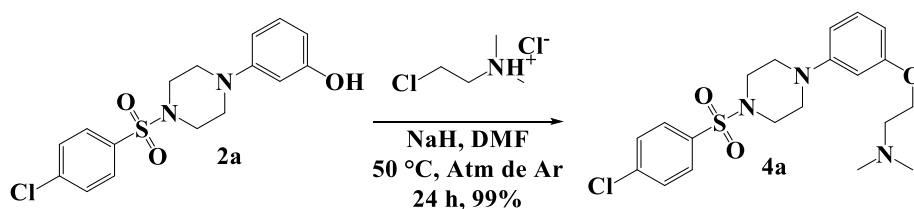
Síntese de 2b



Em um balão, foi adicionado cloreto de 4-clorobenzenossulfonila (59,2 mg, 0,28 mmol) a uma mistura de **1b** (50 mg em 0,28 mL DCM), 1,2 mL de trietilamina e 1 mL de DMF. A reação foi agitada a temperatura ambiente por 12 horas, sendo acompanhada por CCD (9DCM:1MeOH). O tratamento dessa reação se deu pela adição de água, filtragem da mistura e secagem do sólido sob pressão reduzida. Massa obtida: 93,5 mg. Rendimento de 95%.

(2b) ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7.80 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.70 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.59 (s, 1H), 3.16 – 3.10 (m, 4H), 3.10 – 3.04 (m, 4H).

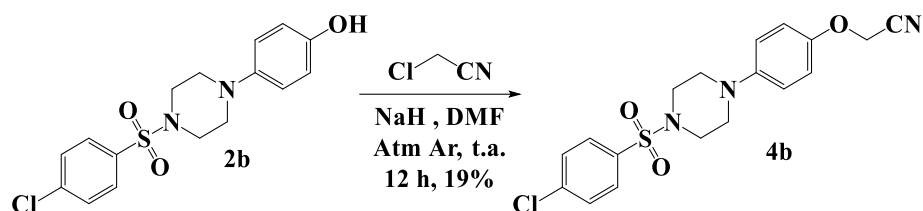
Síntese de 4a



Em um balão sob atmosfera de argônio, adicionou-se cloreto de *N,N*-dimetil-etanamina (24,48 mg, 0,17 mmols) à mistura contendo **2b** (30 mg, 0,085 mmols), NaH 60% (23,8 mg, 0,99 mmol) e 1 mL de DMF anidro. A reação foi agitada à 50 °C por 24 horas, sendo acompanhada por CCD (7AcOEt:3Hex). O tratamento dessa reação se deu pela adição de água destilada, filtragem do sólido e secagem sob pressão reduzida. Massa obtida: 35 mg. Rendimento de 99%.

(4a) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.14 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.48 – 6.42 (m, 3H), 4.02 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.26 – 3.13 (m, 8H), 2.70 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.32 (s, 6H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 160,03, 151,99, 139,79, 134,27, 130,04, 129,61, 129,36, 109,81, 106,08, 104,40, 66,02, 58,49, 49,16, 46,05.

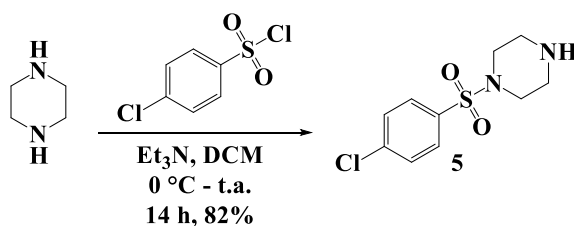
Síntese de 4b



Em um balão sob atmosfera de argônio e a 0 °C, foi adicionado cloroacetonitrila (13,3 μ L, 15,9 mg, 0,210 mmol) à uma mistura de **2a** (50 mg, 0,141 mmol), NaH 60% (129 mg, 3,24 mmol) e DMF 2 mL. A reação foi agitada a temperatura ambiente durante 12 horas, sendo acompanhada por CCD (1Hex:1AcOEt). O tratamento dessa reação se deu pela adição de água, extração com acetato de etila (3x10 mL) e secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro. A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida o que levou ao composto **4b**. Massa obtida: 10,27 mg. Rendimento de 19%.

(4b) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.91 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.16 (s, 8H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 151,41, 147,02, 139,83, 134,27, 129,63, 129,37, 119,04, 116,55, 54,69, 50,15, 46,21, 29,83.

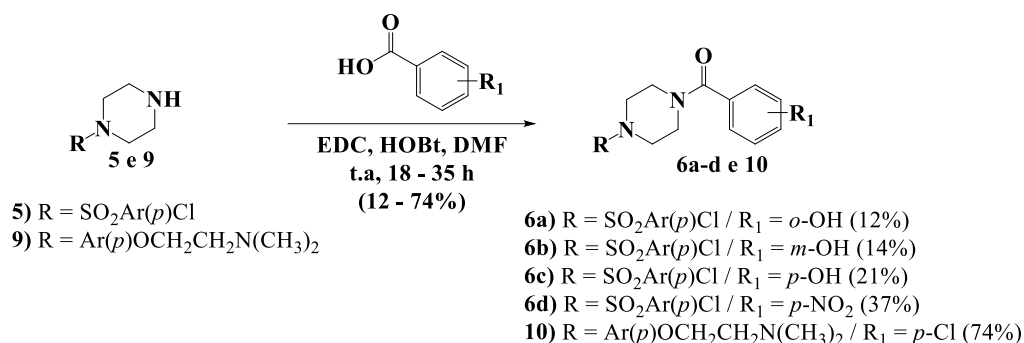
Síntese de 5



Em um balão à 0 °C, adicionou-se, gota a gota, uma solução contendo cloreto de 4-clorobenzenossulfonila em 10 ml de DCM a uma mistura contendo piperazina (1224,4 mg, 14,21 mmols), trietilamina (958,8 mg, 9,475 mmols) e 10 mL de DCM. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 14 horas, sendo acompanhada por CCD (9Hex:1AcOEt). O tratamento dessa reação se deu pela adição de água, extração com acetato de etila (3x10 mL) e secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro. A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida o que levou ao composto **5**. Massa obtida: 1024,6 mg. Rendimento: 82%.

(5) ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.73 (s, 4H), 2.81 – 2.77 (m, 4H), 2.72 – 2.68 (m, 4H).

Procedimento geral para reações de amidações (6a-d e 10)



Em uma solução contendo 1,2 equivalente de ácido benzoico, 1,2 equivalente de EDC, 0,12 equivalentes de HOBT e 1 mL de DMF, foi adicionado 1 equivalente de amina (**5 e 10**). A reação foi agitada à temperatura ambiente por 18 – 35 horas, sendo acompanhada por cromatografia de camada delgada. O tratamento dessa reação se deu pela adição de 20 mL de água destilada, extração com 2x20 mL de acetato de etila, evaporação e secagem da fase orgânica com Na₂SO₄ e purificação em coluna cromatográfica flash.

(6a) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9.35 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 1H), 7.15 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1H), 6.87 – 6.82 (m, 1H), 3.86 – 3.81 (m, 4H), 3.11 – 3.05 (m, 4H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 171,40, 159,43, 140,25, 133,96, 133,44, 129,89, 129,24, 128,31, 118,98, 118,54, 116,04, 46,18.

(6b) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.21 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 6.86 – 6.78 (m, 3H), 6.19 (s, 1H), 3.93 – 3.48 (m, 4H), 3.16 – 2.86 (m, 4H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 170.53, 156.49, 140.16, 135.85, 134.05, 130.08, 129.86, 129.25, 118.81, 117.76, 114.59, 45.52, 29.21.

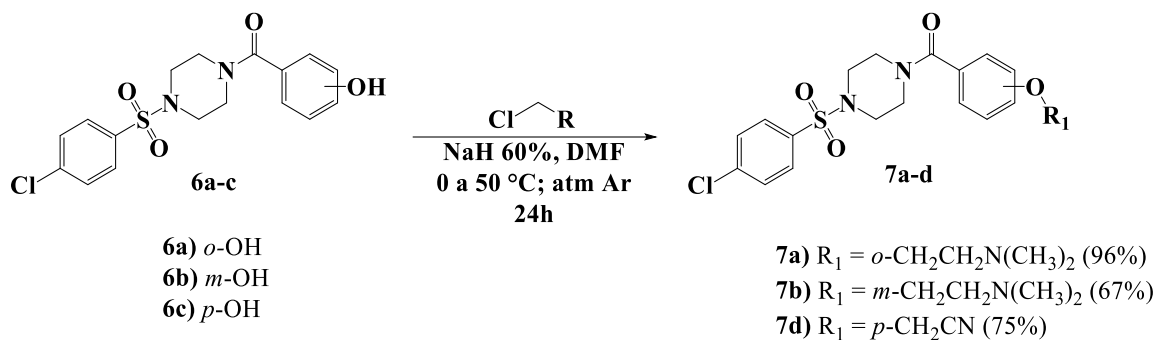
(6c) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.72 (s, 4H), 3.03 (s, 4H).

(6d) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.95 – 3.43 (m, 4H), 3.18 – 2.92 (m, 4H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 168,19, 148,84, 140,93, 140,24, 134,13, 129,88, 129,22, 128,31, 124,15, 46,05, 45,52.

(10) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43 – 7.35 (m, 4H), 6.91 – 6.80 (m, 4H), 4.12 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.99 – 3.40 (m, 8H), 2.90 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 2.47 (s, 6H). ¹³C RMN (101 MHz,

CDCl_3) δ 169,44, 153,40, 145,61, 136,07, 134,13, 128,96, 128,80, 119,02, 115,53, 65,74, 57,92, 51,21, 45,33.

Procedimento geral para síntese de 7a-d



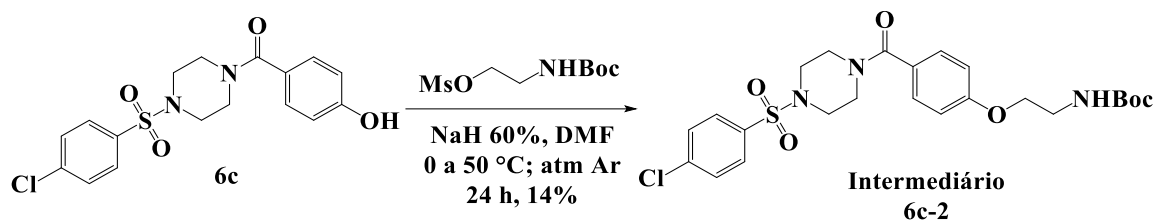
Em um balão sob atmosfera de argônio, adicionou-se 1,5 equivalentes de cloreto de alquila à mistura contendo 1 equivalente de **6a-c**, 4 equivalentes NaH 60% e 1 mL de DMF anidro. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 24 horas, sendo acompanhada por CCD. O tratamento dessa reação se deu pela adição de 10 mL água destilada, extração com acetato de etila (3x10 mL), purificação em coluna cromatográfica, evaporação e secagem do sólido sob pressão reduzida obtendo assim os análogos **7a-d**.

(7a) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.35 – 7.27 (m, 1H), 7.16 (dd, $J = 7.5, 1.6$ Hz, 1H), 6.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.08 – 3.95 (m, 2H), 3.87 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.44 – 3.26 (m, 2H), 3.17 – 3.00 (m, 3H), 2.92 – 2.81 (m, 1H), 2.62 – 2.43 (m, 2H), 2.20 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 167,94, 154,52, 139,96, 134,42, 131,02, 129,74, 129,24, 128,26, 121,53, 112,37, 67,30 58,08, 46,30, 46,07, 45,98, 41,03.

(7b) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.99 – 6.94 (m, 1H), 6.88 – 6.85 (m, 2H), 4.06 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.90 – 3.48 (m, 4H), 3.13 – 2.89 (m, 4H), 2.75 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.35 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 170,32, 159,08, 140,11, 136,16, 134,09, 119,37, 116,50, 113,55, 66,16, 58,29, 45,94.

(7d) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.71 (s, 4H), 3.48 (s, 2H), 3.04 (s, 4H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 169.84, 157.91, 140.12, 134.16, 129.82, 129.62, 129.53, 129.24, 115.08, 114.72, 53.55, 51.00, 46.18.

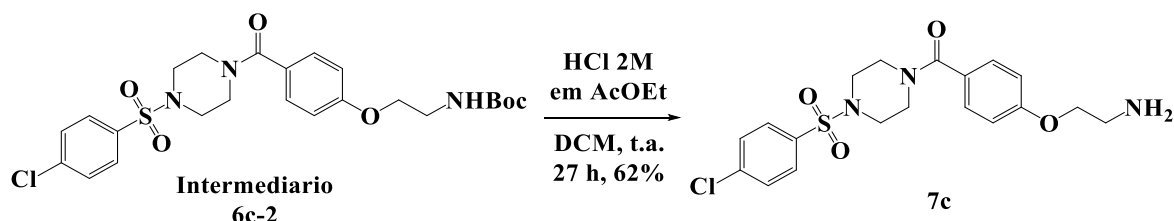
Síntese do intermediário 6c-2



Em um balão sob atmosfera de argônio, adicionou-se o mesilato de alquila (50 mg, 0,208 mmol) à mistura contendo **6c** (52 mg, 0,1379 mmol), NaH 60% (10 mg, 0,457 mmol) e 1 mL de DMF anidro. A reação foi agitada à 60 °C por 24 horas, sendo acompanhada por CCD (98DCM:02MeOH). O tratamento dessa reação se deu pela adição de água destilada, extração com acetato de etila (3x10 mL), purificação com coluna cromatográfica (98DCM:02MeOH), evaporação e secagem sob pressão reduzida. Massa obtida: 10 mg. Rendimento de 14%.

(Intermediário 6c-2) $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.75 (s, 1H), 4.03 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.74 – 3.63 (m, 8H), 3.56 – 3.50 (m, 2H), 1.25 (s, 9H).

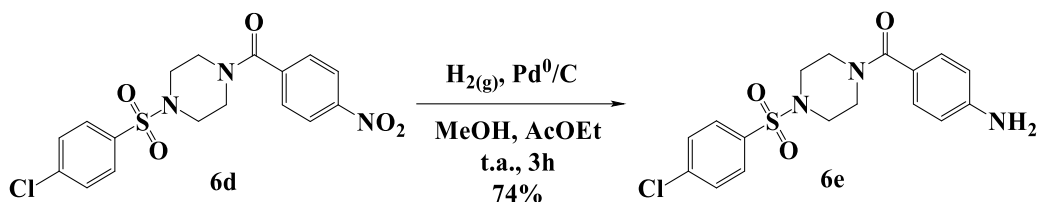
Síntese de 7c



Em um balão, adicionou-se, gota a gota, 1 mL de HCl 2M em acetato de etila a uma solução do **intermediário 6c-2** (10 mg, 0,019 mmols) em 1 mL de DCM. A reação agitada a temperatura ambiente durante 27 horas, sendo acompanhada por CCD (6AcOEt:4Hex). O tratamento dessa reação se deu pela evaporação e secagem do sólido sob pressão reduzida. Massa obtida: 5 mg. Rendimento de 62%.

(7c) $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, MeOD) δ 7.77 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.06 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.27 (s, 2H), 3.69 (s, 4H), 3.38 (s, 2H), 3.07 (s, 4H). $^{13}\text{C RMN}$ (101 MHz, MeOD) δ 172,43, 160,95, 140,79, 135,85, 130,76, 130,59, 130,42, 129,30, 115,73, 66,88, 65,53, 47,24, 40,25.

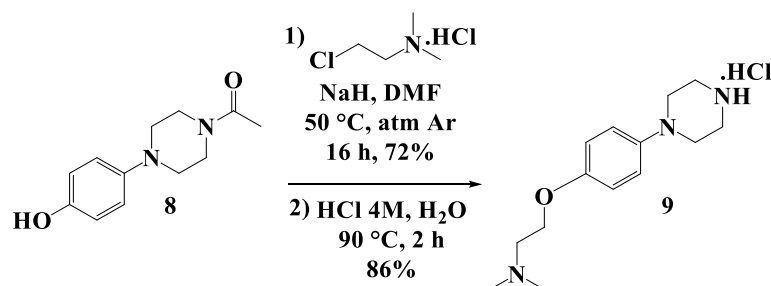
Síntese de 6e



Em um balão, saturou-se com hidrogênio gasoso uma mistura contendo **6d** (20 mg, 0,046 mmols), 10 mg de Pd⁰/C, 5 mL de metanol e 5 mL de acetato de etila. A reação foi agitada a temperatura ambiente por 3 horas, sendo acompanhada por CCD (98DCM:02MeOH). Posteriormente, a mistura foi filtrada em celite com 10 mL de uma mistura de diclorometano e metanol (1:1) e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida obtendo assim, o análogo **6e**. Massa obtida: 13 mg. Rendimento: 74%.

(**6e**) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.76 – 3.68 (m, 4H), 3.06 – 2.98 (m, 4H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 171,08, 148,79, 140,09, 134,25, 129,77, 129,69, 129,25, 114,31, 46,24.

Síntese do intermediário 9

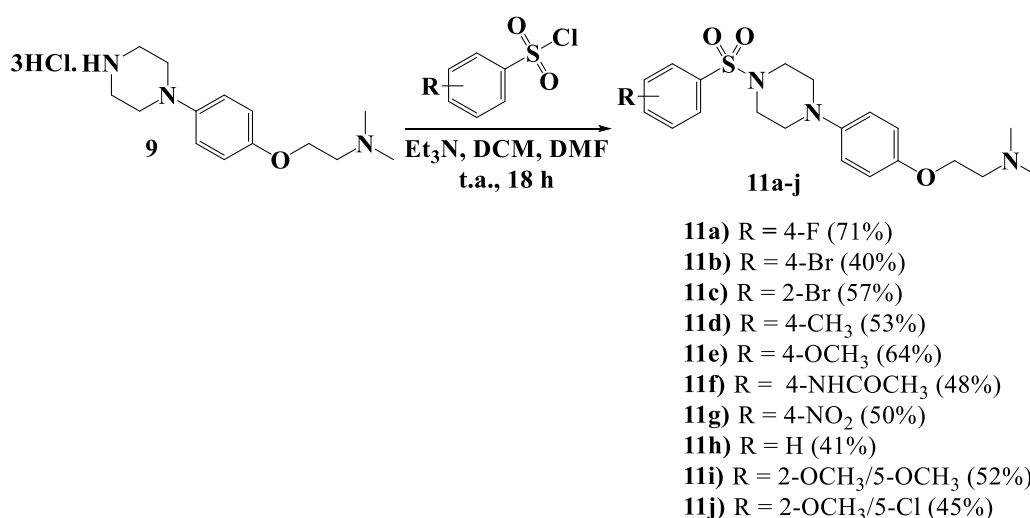


Na etapa 1, sob atmosfera de argônio, adicionou-se cloridrato de *N,N*-dimetil-etanolamina (392 mg, 2,6 mmol) à mistura contendo **8** (300 mg, 1,361 mmol), NaH 60% (380 mg, 9,5 mmol) e 5 mL de DMF anidro. A reação foi agitada à 50 °C por 16 horas, sendo acompanhada por CCD (9DCM:1MeOH). O tratamento dessa reação se deu pela adição de água destilada, extração com acetato de etila (3x20 mL), secagem com Na₂SO₄ anidro, evaporação e concentração do sólido sob pressão reduzida. Massa obtida: 287 mg. Rendimento: 72%. Na etapa 2, foi adicionado o produto da alquilação da etapa 1 (200 mg; 0,686 mmol) a uma solução de HCl 4M (1,1 mL). A reação foi agitada em refluxo por 3 horas, sendo acompanhada por CCD (9DCM:1MeOH). Posteriormente adicionou-se 15 mL de uma solução aquosa de NaHCO₃ 2M,

evaporou-se e o sólido foi seco sob pressão reduzida. Massa obtida: 147 mg, 86% de rendimento.

(9) ^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 10.71 (s, 1H), 9.46 (s, 2H), 7.06 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 4.33 – 4.28 (m, 2H), 3.46 (dd, $J = 10.2, 5.2$ Hz, 2H), 3.37 – 3.31 (m, 4H), 3.24 (s, 4H), 2.81 (d, $J = 4.9$ Hz, 6H).

Procedimento geral para a síntese de 11a-j



Em um balão, adicionou 1 equivalente de **9** e solubilizou em uma mistura de 0,5 ml de trietilamina, 0,2 ml DMF e 0,7 ml de DCM. Adicionou a essa solução, 1,5 equivalente de cloreto de benzenossulfonila substituído. A reação ocorreu sob agitação a temperatura ambiente, durante 18 horas, sendo acompanhada por CCD (DCM:MeOH 9:1). O tratamento dessa reação se deu pela evaporação do DCM, adição de água, filtragem e purificação em coluna usando DCM:MeOH (9:1) como eluente.

(11a) ^1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 7.25 – 7.19 (m, 2H), 6.83 (s, 4H), 4.01 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.21 – 3.09 (m, 8H), 2.71 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.33 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ** 166,50 (d, $J = 254$ Hz), 164,22, 153,99, 145,07, 130,67 (d, $J = 9,3$ Hz), 119,22, 116,54 (d, $J = 22,5$ Hz), 115,46, 66,42, 58,48, 50,63, 46,35, 46,00.

(11b) ^1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.83 (s, 4H), 4.11 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.18 – 3.10 (m, 8H), 2.93 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 2.51 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ** 153,46, 145,34, 134,67, 132,59, 129,45, 128,26, 119,26, 115,48, 65,56, 58,01, 50,57, 46,32, 45,43.

(11c) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 1H), 7.76 (dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 1H), 7.46 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 7.40 (td, $J = 7.6, 1.8$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 1.5$ Hz, 4H), 4.01 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.48 – 3.42 (m, 4H), 3.13 – 3.07 (m, 4H), 2.70 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.33 (s, 2H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 153,88, 145,33, 137,66, 136,04, 133,87, 132,49, 127,70, 120,66, 119,21, 115,45, 66,44, 58,49, 50,97, 46,01, 45,99.

(11d) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.82 (s, 4H), 4.02 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.20 – 3.07 (m, 8H), 2.72 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.34 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 153,80, 145,20, 143,95, 132,48, 129,84, 128,05, 119,11, 115,43, 66,30, 58,41, 50,59, 46,35, 45,91, 21,66.

(11e) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.01 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.82 (s, 4H), 4.04 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.17 – 3.08 (m, 8H), 2.79 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.38 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 163,18, 153,62, 145,10, 130,00, 126,96, 118,98, 115,31, 114,27, 66,10, 58,26, 55,65, 50,44, 46,22, 45,74.

(11f) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.77 – 7.68 (m, 4H), 7.43 (s, 1H), 6.82 (s, 4H), 4.01 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.19 – 3.08 (m, 8H), 2.71 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.33 (s, 6H), 2.22 (s, 3H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 168,29, 153,61, 144,87, 141,96, 130,18, 129,01, 119,11, 118,87, 115,18, 66,17, 58,18, 50,31, 46,04, 45,67, 24,58.

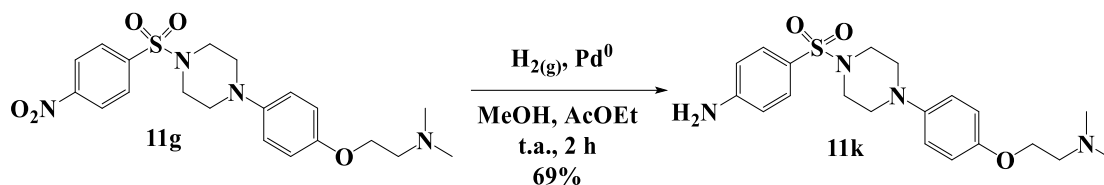
(11g) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.40 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.98 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.83 (s, 4H), 4.04 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.26 – 3.20 (m, 4H), 3.16 – 3.11 (m, 4H), 2.76 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.37 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 154,05, 150,48, 144,99, 142,01, 129,11, 124,52, 119,38, 115,53, 66,33, 58,41, 50,72, 46,35, 45,89.

(11h) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.64 – 7.58 (m, 1H), 7.55 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 6.82 (s, 4H), 4.00 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.21 – 3.08 (m, 8H), 2.70 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.32 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 153.92, 145.10, 135.55, 133.09, 129.24, 127.98, 119.14, 115.43, 66.41, 58.46, 50.62, 46.35, 45.98.

(11i) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,45 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 7,06 (dd, $J = 9,0, 3,1$ Hz, 1H), 6,95 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,84 (s, 4H), 4,04 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,43 – 3,36 (m, 4H), 3,13 – 3,06 (m, 4H), 2,77 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 2,37 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 153,68, 153,26, 151,31, 145,54, 126,91, 120,56, 119,12, 116,36, 115,49, 114,19, 66,25, 58,31, 56,81, 56,20, 51,19, 46,27, 45,77.

(11j) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,90 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 7,47 (dd, $J = 8,8, 2,7$ Hz, 1H), 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,85 (s, 4H), 4,03 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,44 – 3,37 (m, 4H), 3,13 – 3,06 (m, 4H), 2,75 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 2,36 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 155,73, 153,82, 145,42, 134,32, 131,48, 127,98, 125,81, 119,19, 115,51, 113,87, 66,34, 58,37, 56,54, 51,24, 46,20, 45,84.

Síntese de 11k



Em um balão, foi pesado 20 mg (0,046 mmol) de **11g**, adicionou-se 10 ml de uma mistura de metanol e acetato de etila, 10 mg de paládio em carbono e borbulhou hidrogênio gasoso na solução. A reação foi agitada a temperatura ambiente por 2 horas, sendo acompanhada por CCD (9 DCM:1 MeOH). A mistura foi filtrada em celite com 10 mL de uma solução de diclorometano e metanol (1:1) e o filtrado concentrado sob pressão reduzida. Massa obtida: 13 mg. Rendimento de 69%.

(11k) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.83 (s, 4H), 6.70 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.14 (s, 2H), 4.03 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.15 – 3.07 (m, $J = 1.5$ Hz, 8H), 2.75 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.36 (s, 6H). **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 153.74, 150.90, 145.35, 130.18, 123.71, 119.08, 115.48, 114.17, 66.31, 58.36, 50.58, 46.36, 45.82.

6.5 - Procedimento Experimental (Biológico)

6.5.1 - Ensaio *in vitro* contra as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuen lacZ C4)

6.5.1.1 - Manutenção de células para plaqueamento

Os experimentos foram realizados conforme protocolo descrito por Buckner (1996) modificado. Culturas de células NTCT clone 929 (L929) (ATCC CCL 1) de tecido conectivo de camundongo, em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol e suplementado com SBF 10% e glutamina 2mM, foram semeadas em garrafas de 25cm², 150.000 células, ou garrafas de 75cm², 450.000 células. As culturas foram incubadas em estufa 37°C 5% CO₂. Culturas em garrafas de 25cm² ou 75cm² foram infectadas após um período de aproximadamente 24 horas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tulahuen transformada para expressar o gene

da β -galactosidase, 20 parasitas por célula. Os parasitas que não penetraram foram retirados por lavagem após 24h, e a cultura foi incubada em estufa 37°C 5% CO₂.

6.5.1.2 - Plaqueamento das células, infecção e tratamento

Para o teste de atividade anti *T. cruzi*, uma placa de 96 poços foi semeada com 4.000 células NTCT clone 929 (L929) (ATCC CCL 1) de tecido conectivo de camundongo em 80 µl por poço de RPMI com vermelho fenol e suplementado. A placa foi incubada “overnight” em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As células foram infectadas com 40.000 tripomastigotas por poço, diluídos em 20 µl de RPMI com vermelho fenol suplementado. A placa foi incubada por 2 horas a 37°C 5% CO₂ e os parasitas que não penetraram foram retirados por substituição com 200 µl por poço de RPMI sem vermelho de fenol e suplementado. A placa foi novamente incubada a 37°C e 5% CO₂ por 48 horas para o estabelecimento da infecção. Após 48 horas, o meio de cultura foi trocado por 180 de RPMI sem vermelho de fenol suplementado e 20 µl do composto a ser testado. Compostos pré-diluídos em DMSO tiveram uma concentração máxima de 10% de DMSO na solução-estoque. A adição dos compostos à placa foi realizada da seguinte forma: 180 µl de RPMI suplementado e sem vermelho de fenol foram adicionados a cada poço; a seguir, 20 µl dos compostos solubilizados em água ou meio foram adicionados e foi realizada a homogeneização com a pipeta (determinação IC50) ou agitador de placas (triagem). Desta forma, a concentração final dos compostos pós-diluição no meio foi de 1 a 80 µg/ml. A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 96 horas. Após esse período, foram adicionados 50 µl por poço do substrato CPRG 500 µM com nonidet p40 0,5% e a leitura da placa foi realizada 16 a 20 horas após a adição do substrato, em leitor de ELISA com filtro de 570nm. Adicionalmente, foram utilizados os seguintes controles em cada placa: culturas de células não infectadas por parasitas e sem adição de compostos, culturas de células infectadas pelo parasita sem adição de compostos, culturas de células infectadas pelo parasita e tratadas com Benznidazol a 1 µg/ml, culturas de células infectadas pelo parasita tratadas com DMSO 1%. A análise foi realizada considerando a redução do desenvolvimento da infecção estabelecida, promovida pelo composto testado, em relação ao cultivo de células infectadas pelo parasita na ausência de compostos.

6.5.2 - Ensaio alamarBlue®

6.5.2.1 - Manutenção de células para plaqueamento

Os experimentos foram realizados utilizando-se culturas de células NTCT clone 929 (L929) (ATCC CCL 1) de tecido conectivo de camundongo, em meio RPMI 1640 com vermelho de *Hercos*, G. F. L.

fenol e suplementado com SBF 10% e glutamina 2mM. Para a manutenção, as células foram semeadas em garrafas de 25cm², 150.000 células, ou garrafas de 75cm², 450.000 células.

6.5.2.2 - Plaqueamento das células e tratamento

A placa de 96 poços foi semeada com 4.000 células em 200 µl por poço de RPMI com vermelho fenol e suplementado e a placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas. Após incubação por 72 horas a 37°C o meio de cultura foi substituído pelas soluções dos compostos que apresentaram um IC₅₀ sobre o parasita igual ou maior que o Benznidazol no ensaio da β-galactosidase em concentrações entre 78 e 200 µg/ml. Os compostos foram diluídos num volume final de 200 µl em RPMI-1640 sem vermelho de fenol e suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2 mM de glutamina.

6.5.3 - Ensaios *in vitro* contra *L. infantum*

6.5.3.1 - Avaliação da suscetibilidade *in vitro*: método fluorimétrico

Após 72 horas da diferenciação de macrófagos THP-1 (5x10⁴), em placas pretas de 96 poços (*Corning Incorporated, Corning, NY*), eles foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária (20 parasitos por macrófago) por 4 horas. Após três lavagens com PBS 1X, as células infectadas foram tratadas com várias concentrações dos compostos. Foram realizados dois experimentos independentes, em quadruplicata de cada amostra. A concentração do fármaco que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC₅₀) foi determinada pela diminuição da fluorescência dos parasitos na ausência e presença do fármaco, após 72 horas de exposição, por meio de um leitor de microplacas (*SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA*) com valores de excitação e emissão: 554 e 581nm, respectivamente.

6.5.3.2 - Avaliação da citotoxicidade em macrófagos derivados de células THP-1

Macrófagos THP-1 (5,0x10⁴) foram diferenciados em placas de 96 poços e incubadas por 72 horas em meio RPMI 1640 suplementado à 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Após o período de diferenciação das células, o meio de cultura foi removido, e adicionado 180µL de meio RPMI 1640 suplementado. Posteriormente, os macrófagos foram tratados (20 µL) com os fármacos, empregando-se diluições seriadas com concentrações dos compostos, durante 72 horas à 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂. Após o período de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de *Alamar Blue (Invitrogen™)*. Foram adicionados aos poços 20µL de uma solução de *Alamar Blue* em uma diluição de 1:1 e após quatro horas de incubação a leitura foi realizada através dos seguintes comprimentos de onda: 570 e 600nm.

7 - Referências bibliográficas

AGÊNCIA FIOCRUZ, disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/estudo-in-vitro-revela-composto-com-alta-atividade-e-seletividade-contr-o-t-cruzi>, 2009. Acessado em: 15/02/2023.

BENCHIMOL, Jaime Larry et al. Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas, v. 14, p. 611-626, 2019. <https://doi.org/10.1590/1981.81222019000200017>

CDC, disponível

em <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html#:~:text=Life%20Cycle%3A&text=Inside%20the%20host%2C%20the%20trypomastigotes,the%20circulation%20as%20bloodstream%20trypomastigotes%20.>, acessado em 09/02/2023.

CDC, disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acessado em 26/04/2023.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 110(3), 277-282, 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>

DNDi, disponível em <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>, acesso em: 10 de janeiro de 2023.

DNDi, disponível em: [https://dndi.org/diseases/neglected-tropical-](https://dndi.org/diseases/neglected-tropical-diseases/?gclid=Cj0KCQjw3a2iBhCFARIsAD4jQB1U2ovYWwf4Hf88dZdHj545HtSrKWdSQ_bzJn3ypAa0lQ82vxE_caAugREALw_wcB)

[diseases/?gclid=Cj0KCQjw3a2iBhCFARIsAD4jQB1U2ovYWwf4Hf88dZdHj545HtSrKWdSQ_bzJn3ypAa0lQ82vxE_caAugREALw_wcB](https://dndi.org/diseases/neglected-tropical-diseases/?gclid=Cj0KCQjw3a2iBhCFARIsAD4jQB1U2ovYWwf4Hf88dZdHj545HtSrKWdSQ_bzJn3ypAa0lQ82vxE_caAugREALw_wcB). Acessado em: 24/04/2023.

FARIAS, Hildeth Máisa Torres et al. Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral humana nas regiões de saúde do norte de Minas Gerais. Enfermagem em Foco, v. 10, n. 2, 2019. <https://doi.org/10.21675/2357-707X.2019.v10.n2.1887>

FIOCRUZI, disponível em:

<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/tratamento.htm>. Acessado em 27/04/2023.

FRANCISCO, Amanda Fortes et al. Nitroheterocyclic drugs cure experimental Trypanosoma cruzi infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. Scientific reports, v. 6, n. 1, p. 35351, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep35351>

HERCOS, Guilherme F. de L. et al. Physicochemical characterization, bioactive compounds and antioxidant capacity of bitter melon. *Horticultura Brasileira*, v. 39, p. 397-403, 2021. <https://doi.org/10.1590/s0102-0536-20210408>

HOWARD, E. J., XIONG, X., CARLIER, Y., SOSA-ESTANI, S., e BUEKENS, P. . Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 121(1), 22-33, 2014. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12396>

HOTEZ, Peter J. et al. What constitutes a neglected tropical disease?. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 1, p. e0008001, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008001>

KATSUNO, Kei et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews drug discovery*, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrd4683>

LIDANI, K.C.F. et al.; Chagas Disease: from discovery to a worldwide health problem. *Frontiers in Public Health*, v. 7, n. 166, p. 1 - 13, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>

MARTINHO, A. C. C.; DE MELO RESENDE, D.; LANDIN, E. S.; DIT LAPIERRE, T. J. W. J.; BERNARDES, T. C. D.; MARTINS, L. C.; FERREIRA, R. S.; MURTA, S. M. F.; DE OLIVEIRA REZENDE JÚNIOR, C. Synthesis, Design, and Structure-Activity Relationship of a Benzenesulfonylpiperazine Series against *Trypanosoma cruzi*. *ChemMedChem*, v. 17, p. e2022002, 2022. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200211>

MEADE, John C. P-type transport ATPases in *Leishmania* and *Trypanosoma*. *Parasite*, v. 26, 2019. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019069>

MESSENGER, L. A., & BERN, C. Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives. *Current opinion in infectious diseases*, 31(5), 415-421, 2018. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000478>

MINISTERIO DA SAUDE, disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>. Acessado em: 25/04/2023.

MINISTERIO DA SAUDE, <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/atualizacao-21-10-2022/lv-graficos-e-mapas.pdf>, 2021. Acessado em: 25/04/2023.

MSF, disponível em: <https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas/#:~:text=A%20doen%C3%A7a%20de%20Chagas%20%C3%A9,na%20Europa%20e%20na%20%C3%81sia.> acesso em: 10 de janeiro de 2023.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, Lara et al. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. International journal of antimicrobial agents, v. 30, n. 4, p. 325-329, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.013>

PENA I. et al.; New Compound Sets Identified from High Throughput Phenotypic Screening Against Three Kinetoplastid Parasites: A Open Resource. Scientific Reports, v. 5, n. 8771, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep08771>

RAJAO, Matheus Andrade et al. Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. Environmental and molecular mutagenesis, v. 55, n. 4, p. 309-321, 2014. <https://doi.org/10.1002/em.21839>

READY, Paul D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clinical epidemiology, p. 147-154, 2014. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>

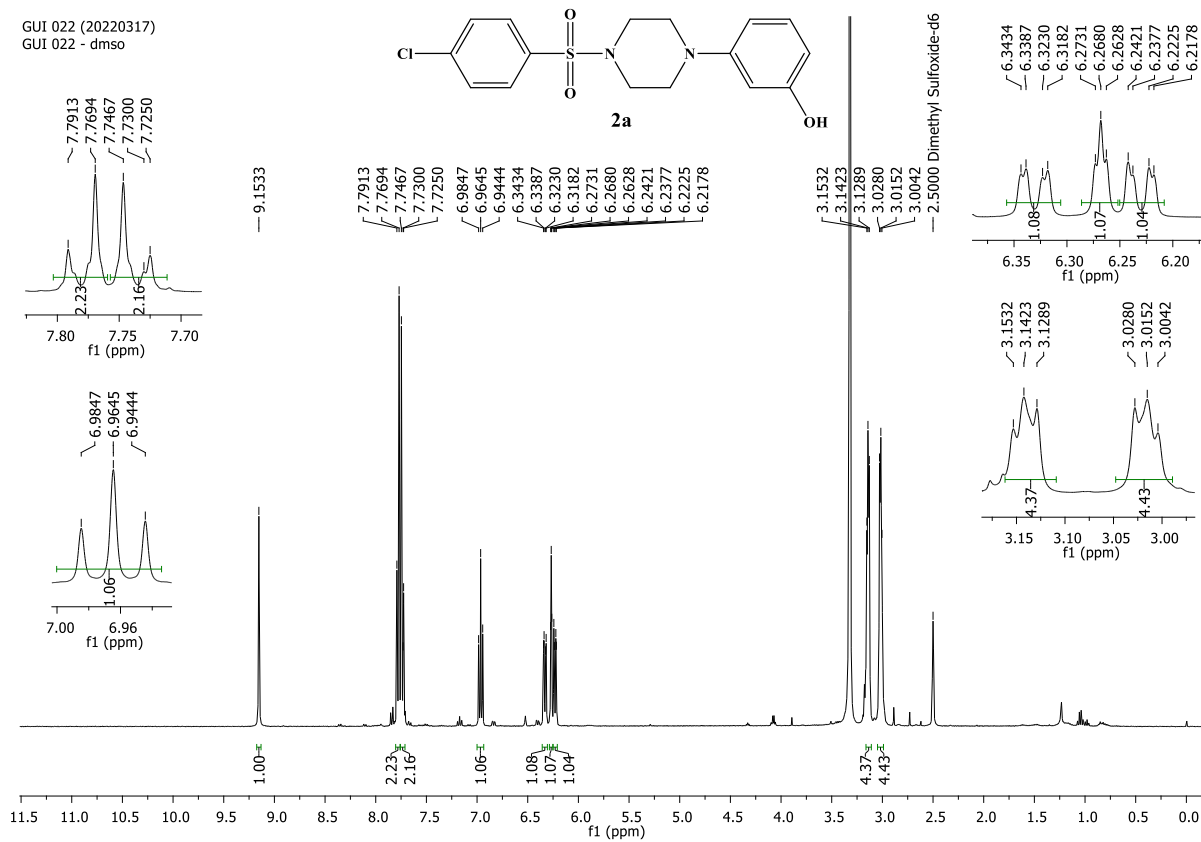
STONE, Neil RH et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. Drugs, v. 76, p. 485-500, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0538-7>

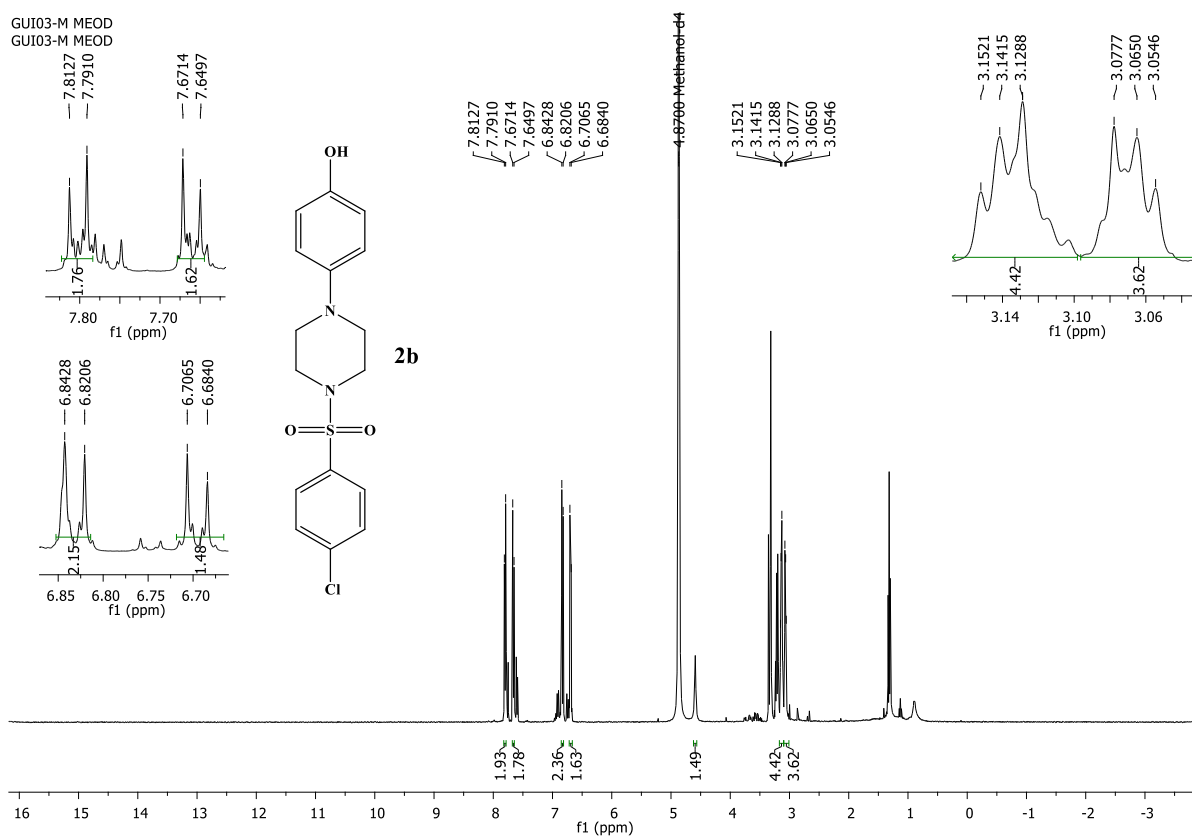
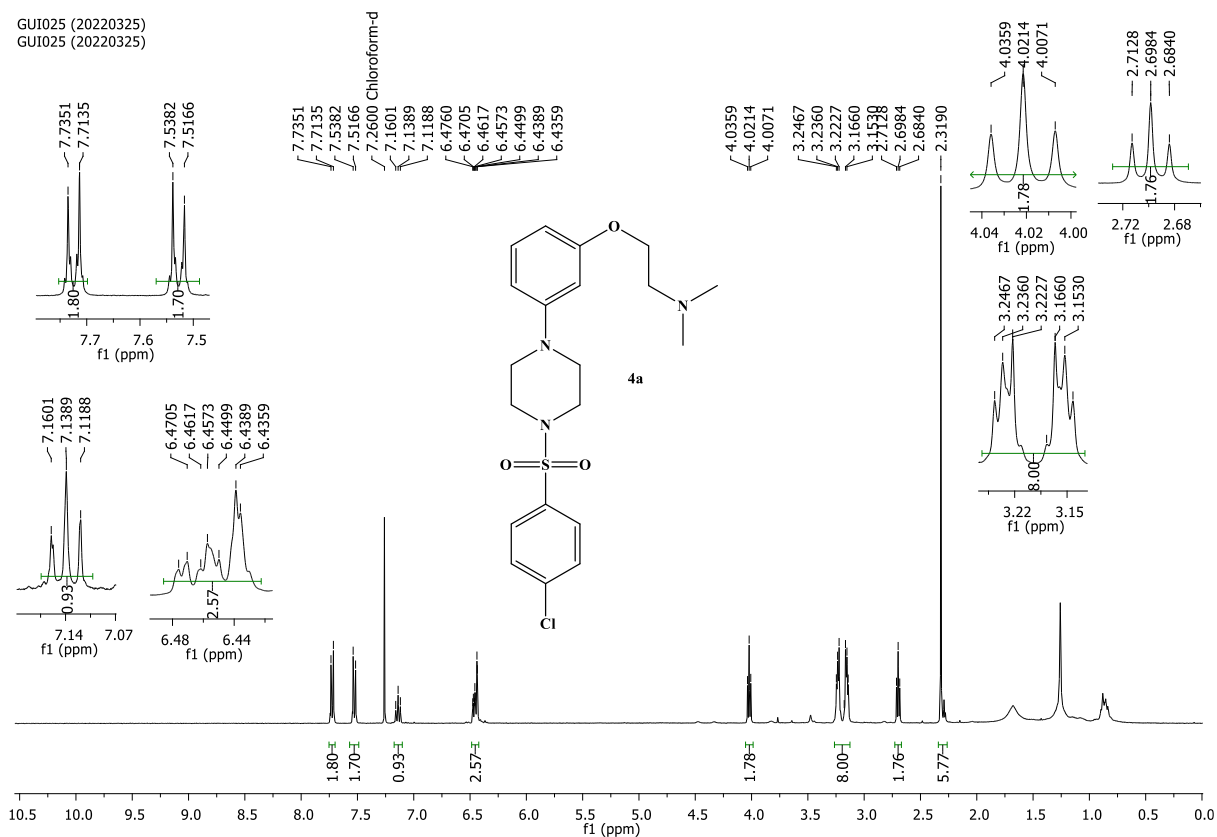
VIOTTI, R., VIGLIANO, C. LOCOCO, B. Alvarez, M.G. M. Petti, BERTOCCHI, G., ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities Expert Rev. Anti-infect. Ther., 2009. <https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157>

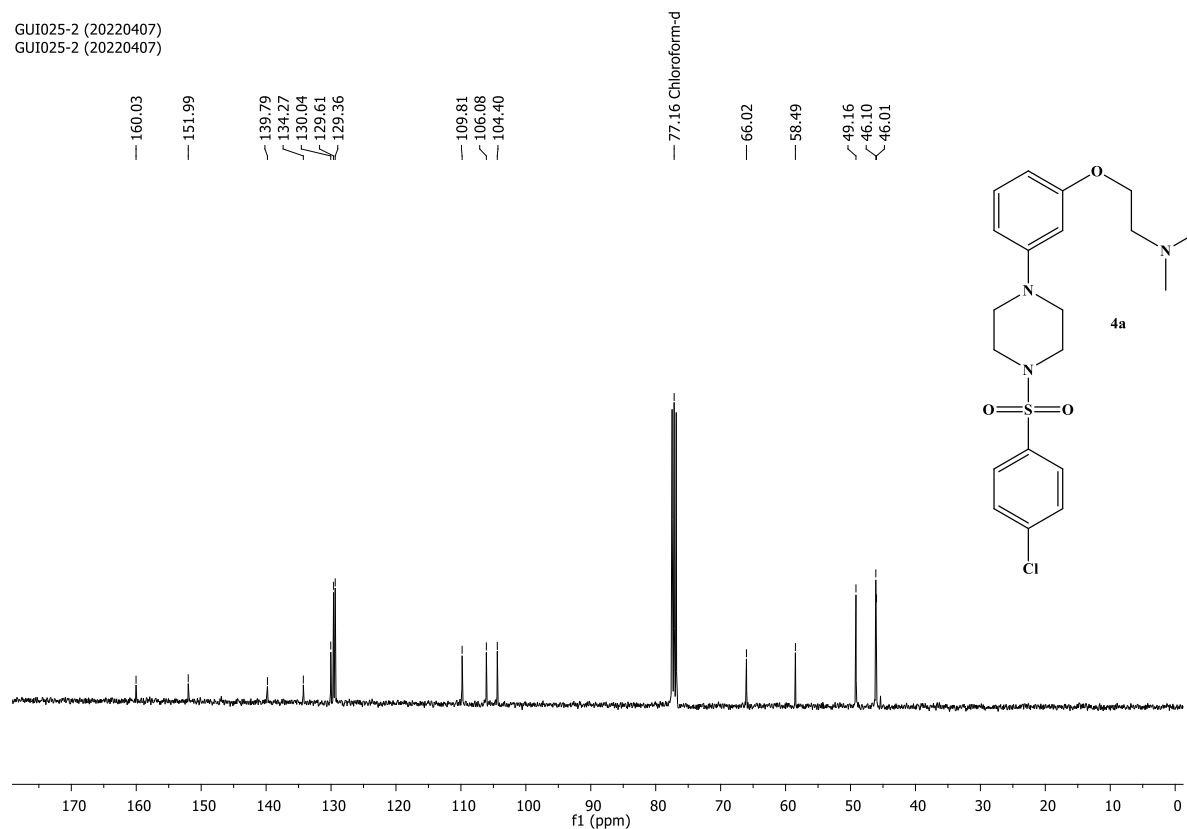
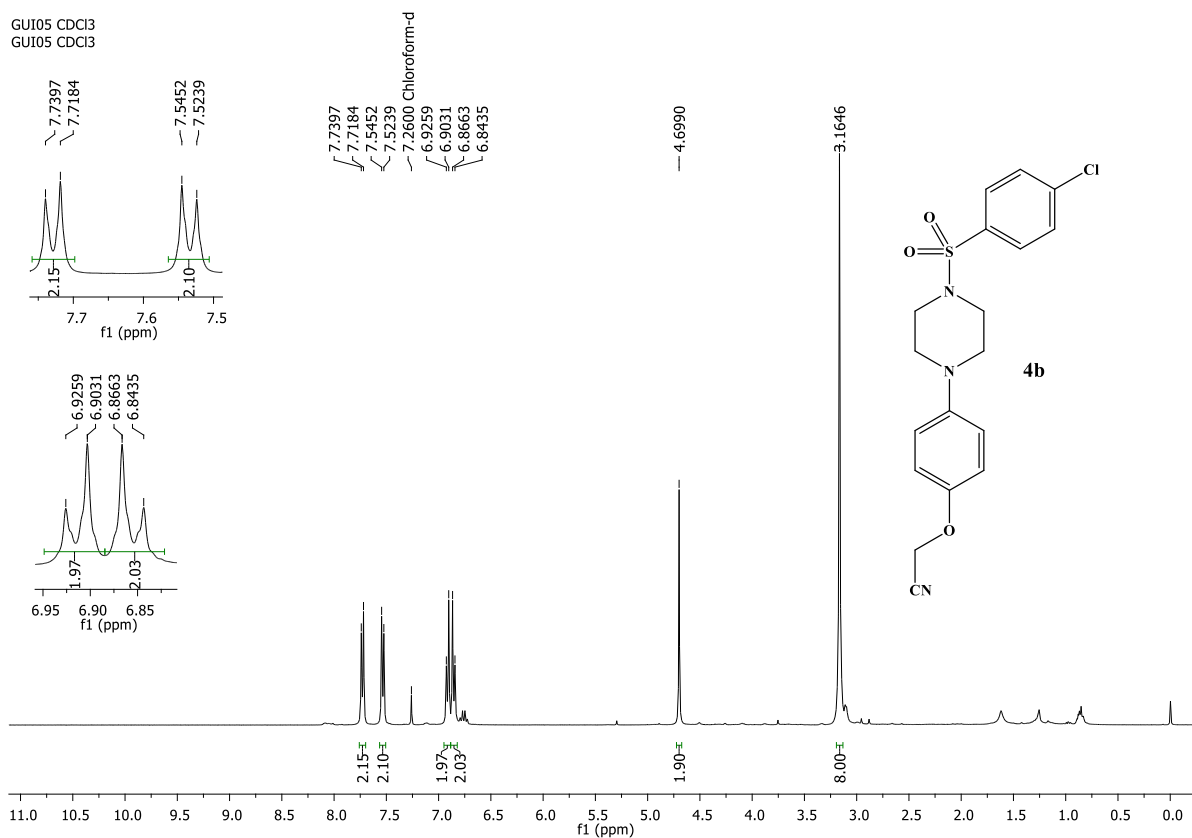
WHO, disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, acessado em 10 de janeiro de 2023.

WHO, disponível em: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1. Acessado em: 24/04/2023.

Anexo

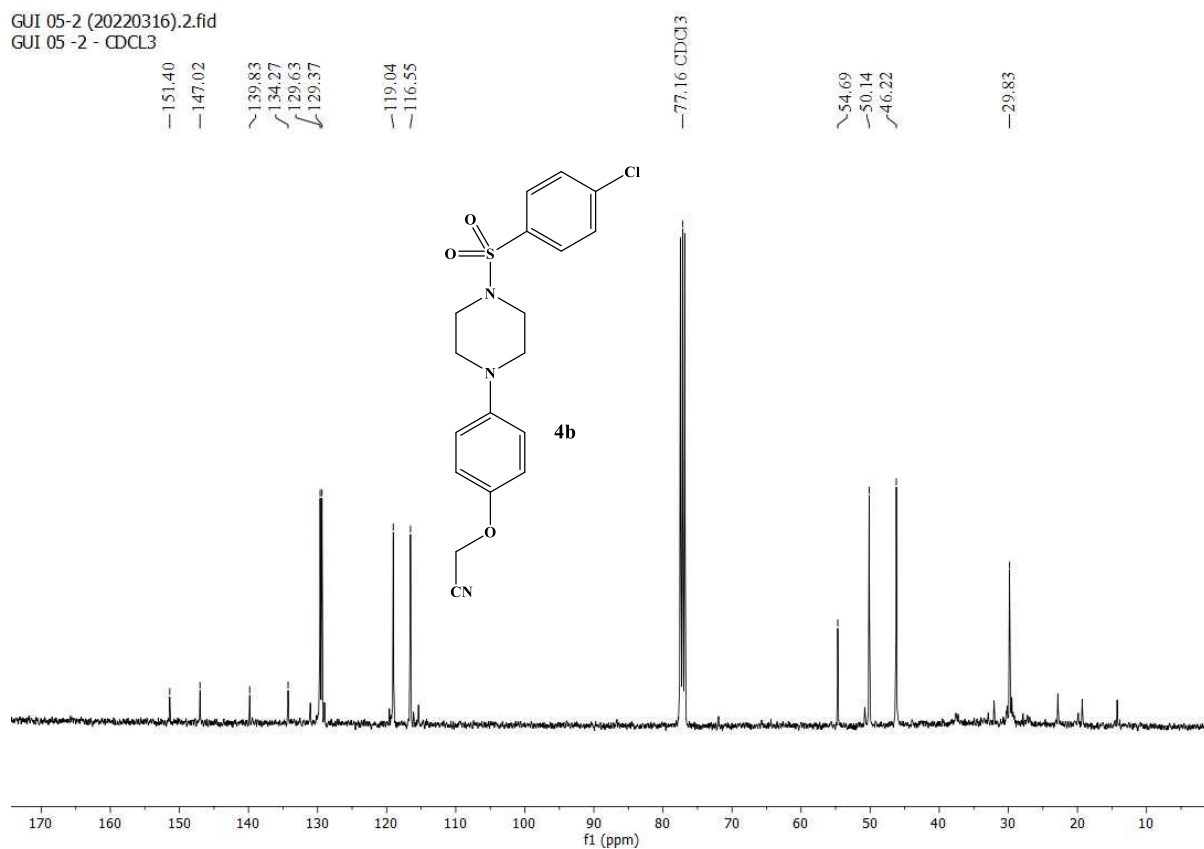
Espectro 1 - RMN de ^1H do composto **2a**

Espectro 2 - RMN de ^1H do composto **2b**Espectro 3 - RMN de ^1H do composto **4a**.

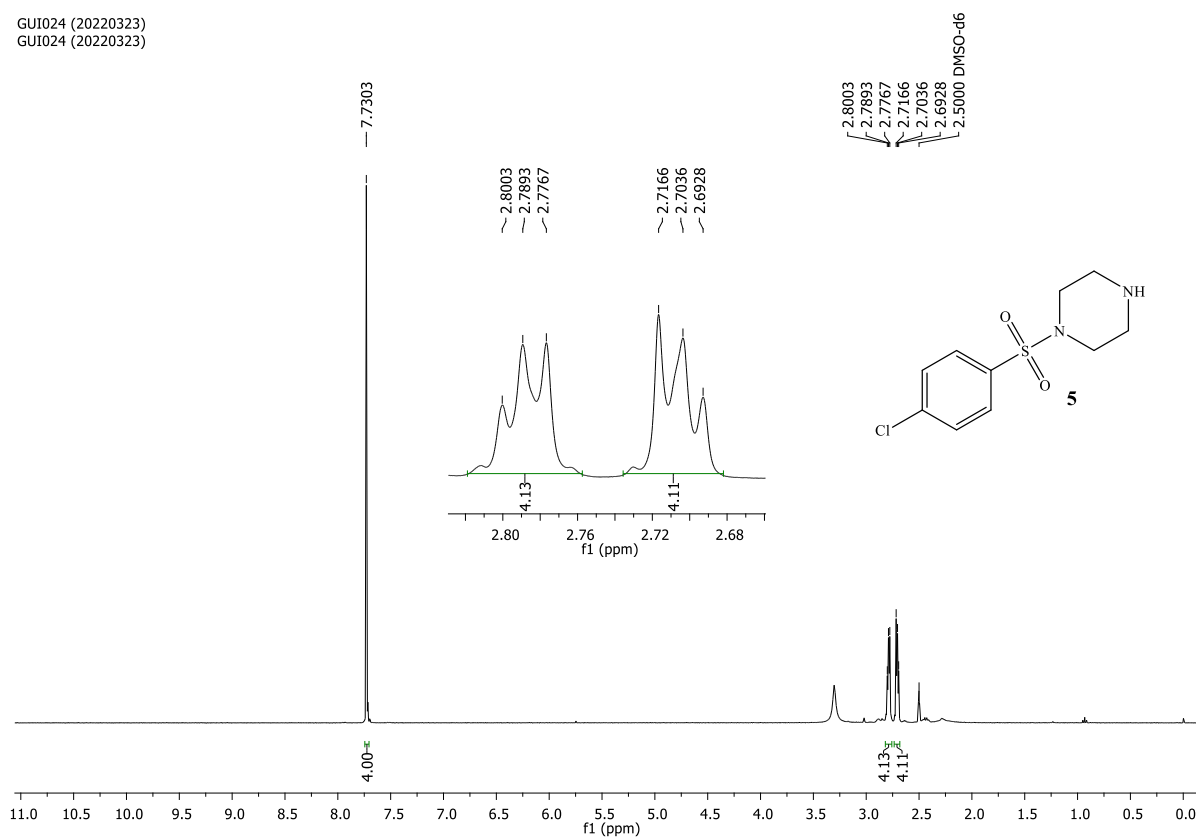
Espectro 4 - RMN de ^{13}C do composto **4a**GUI025-2 (20220407)
GUI025-2 (20220407)Espectro 4 - RMN de ^1H do composto **4b**GUI05 CDCl3
GUI05 CDCl3

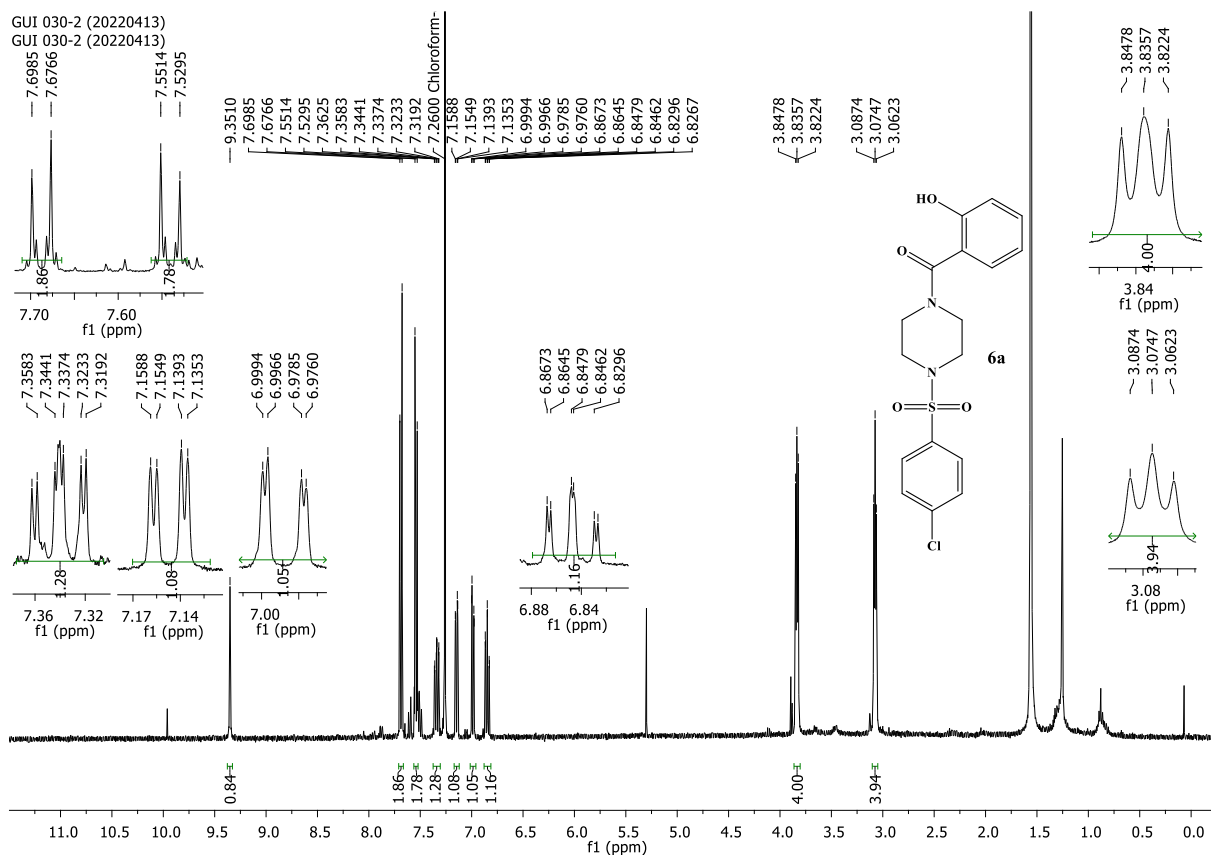
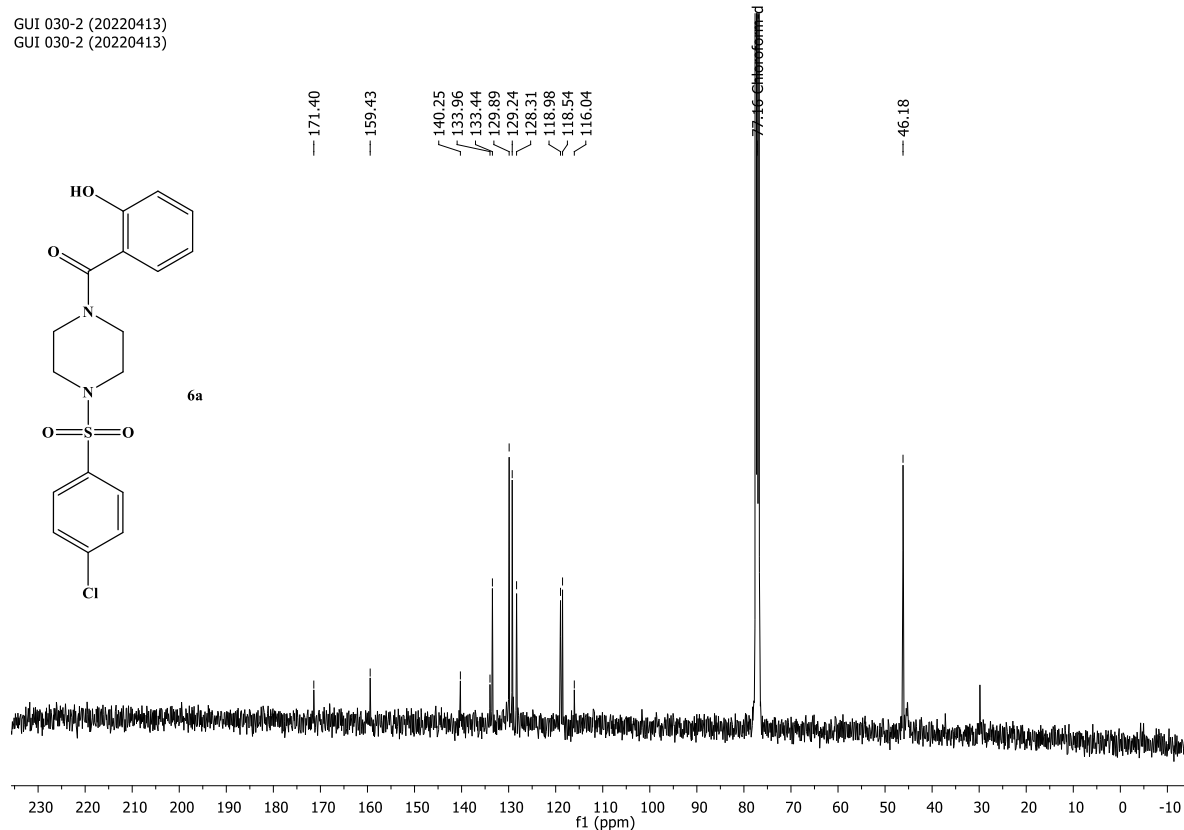
Espectro 5 - RMN de ^{13}C do composto **4b**

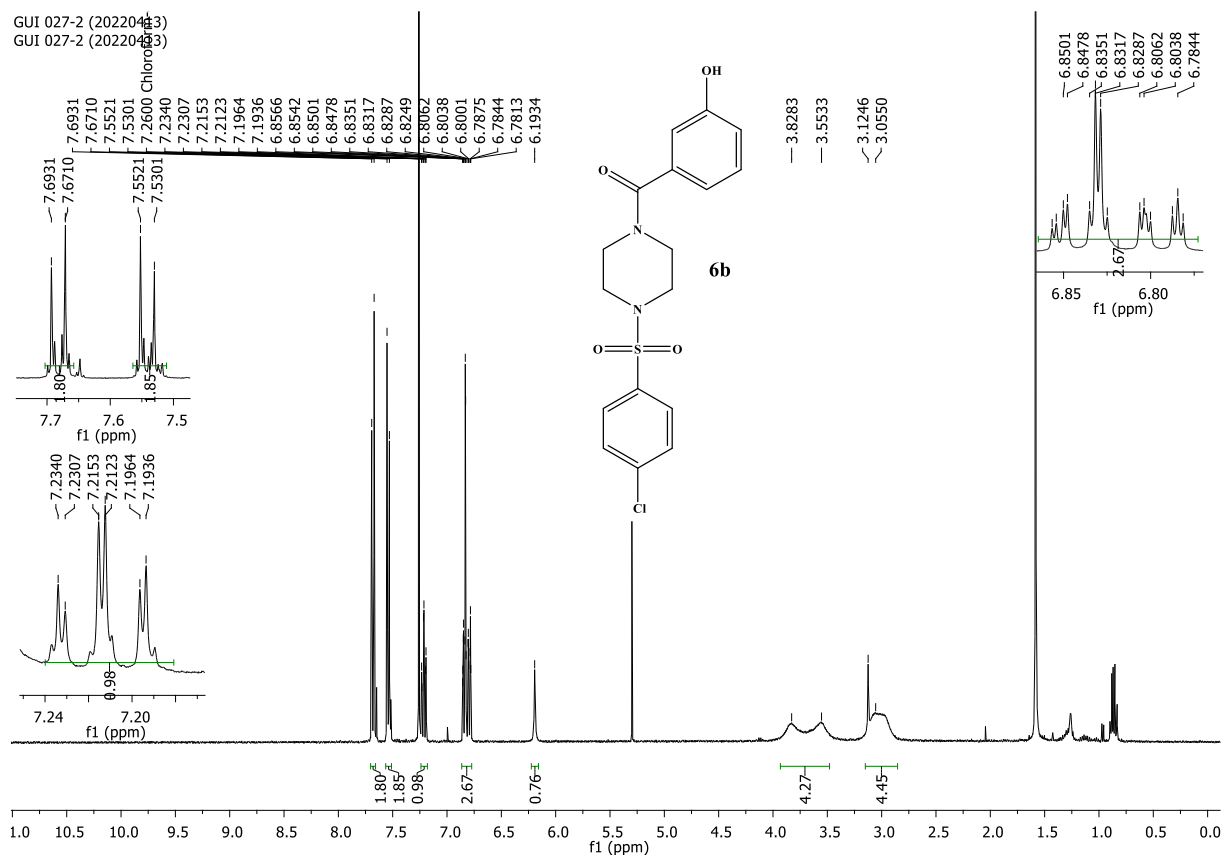
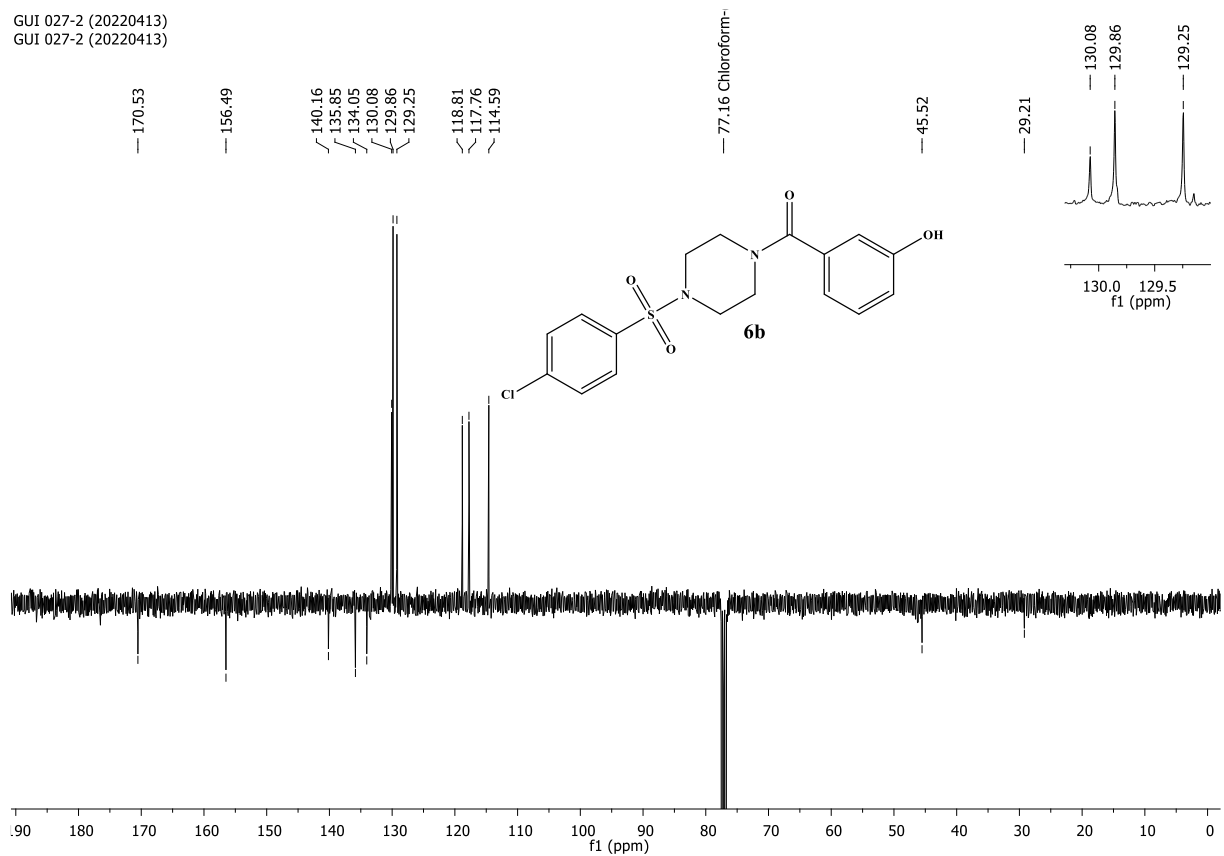
GUI 05-2 (20220316).2.fid
GUI 05-2 - CDCl_3

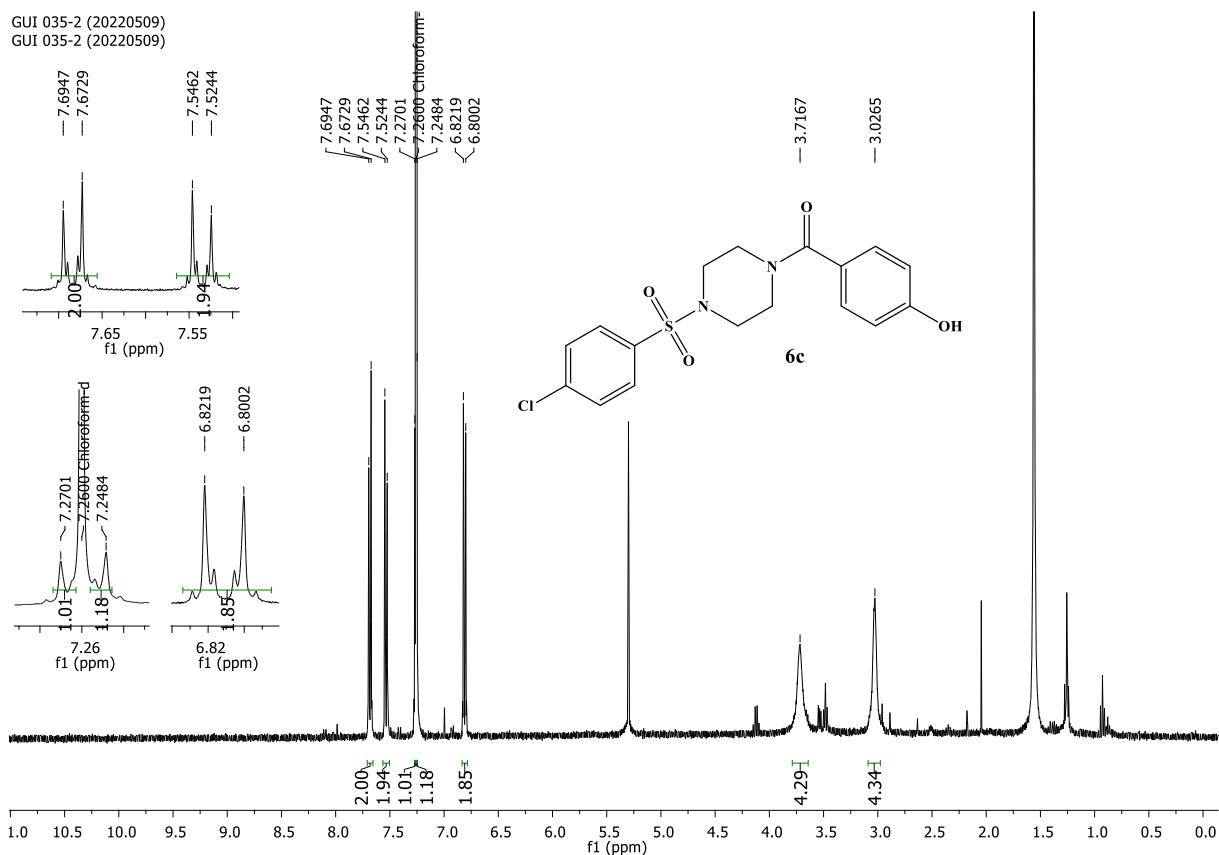
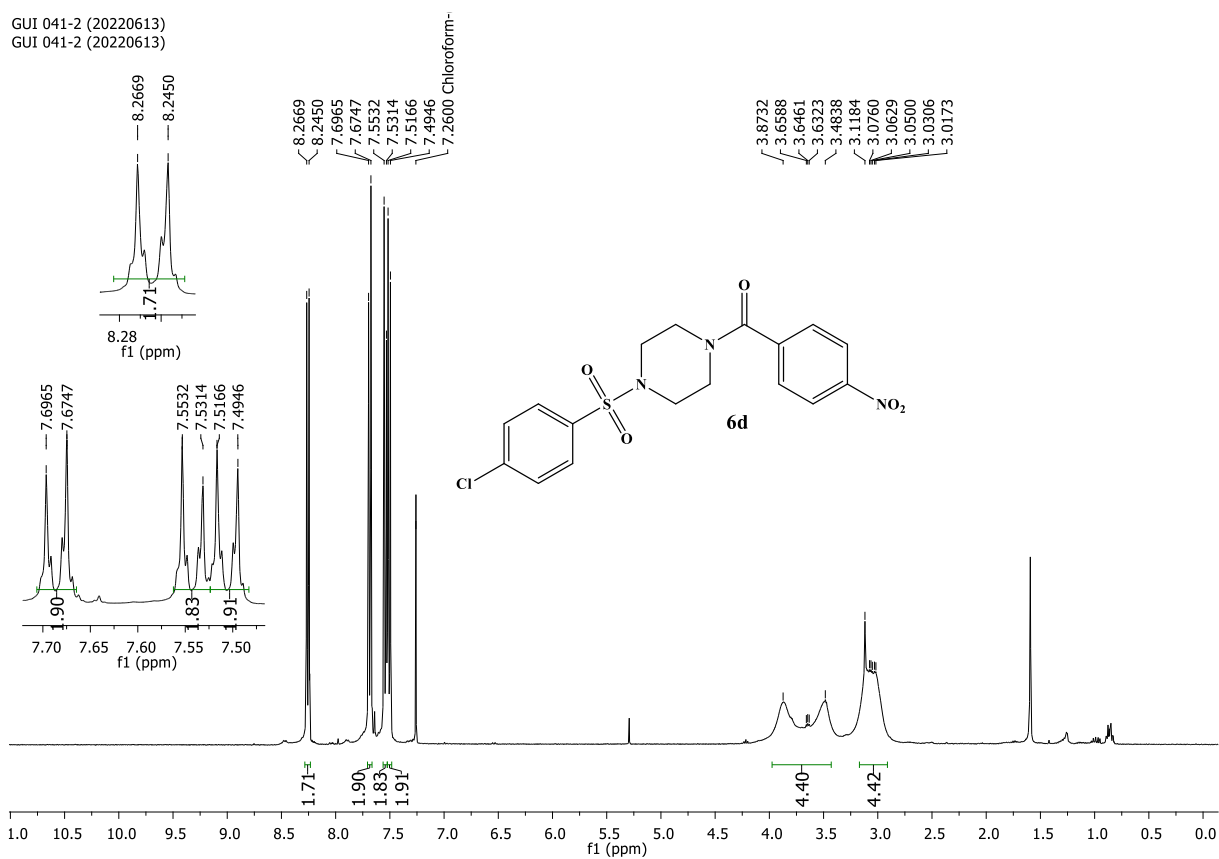
Espectro 6 - RMN de ^1H do composto **5**

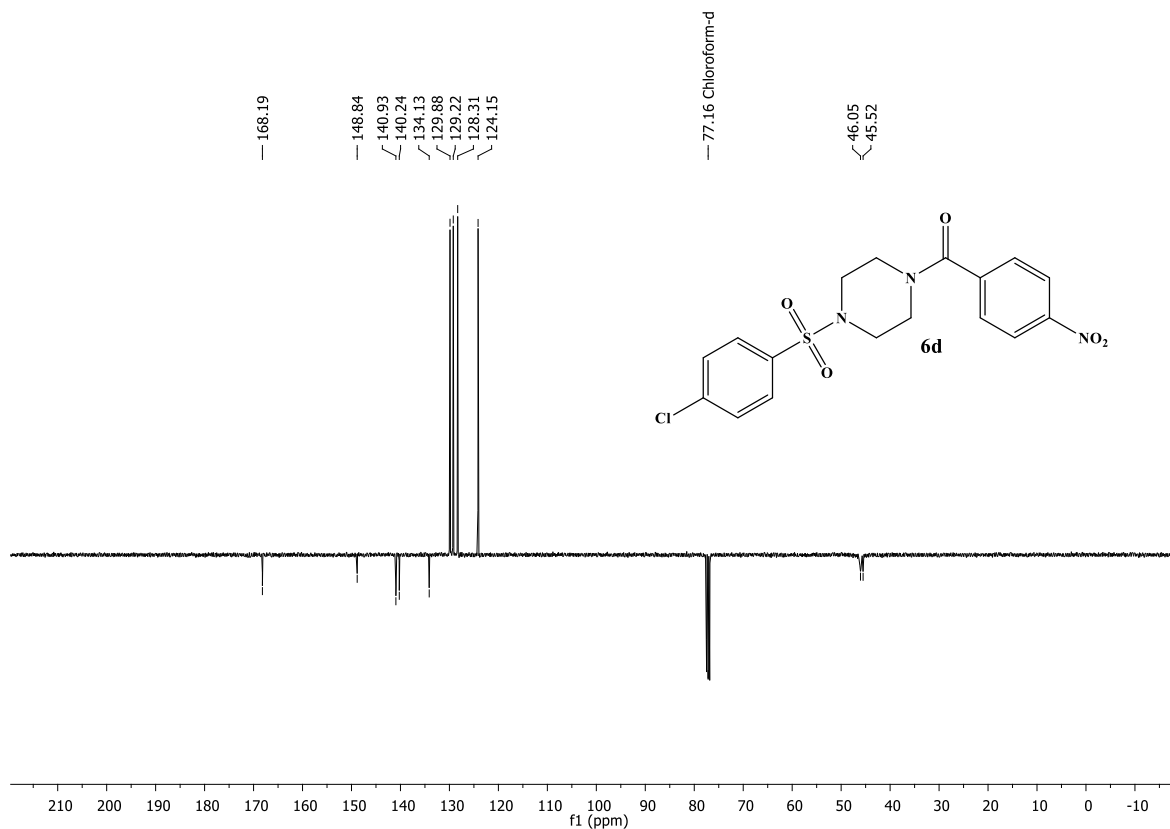
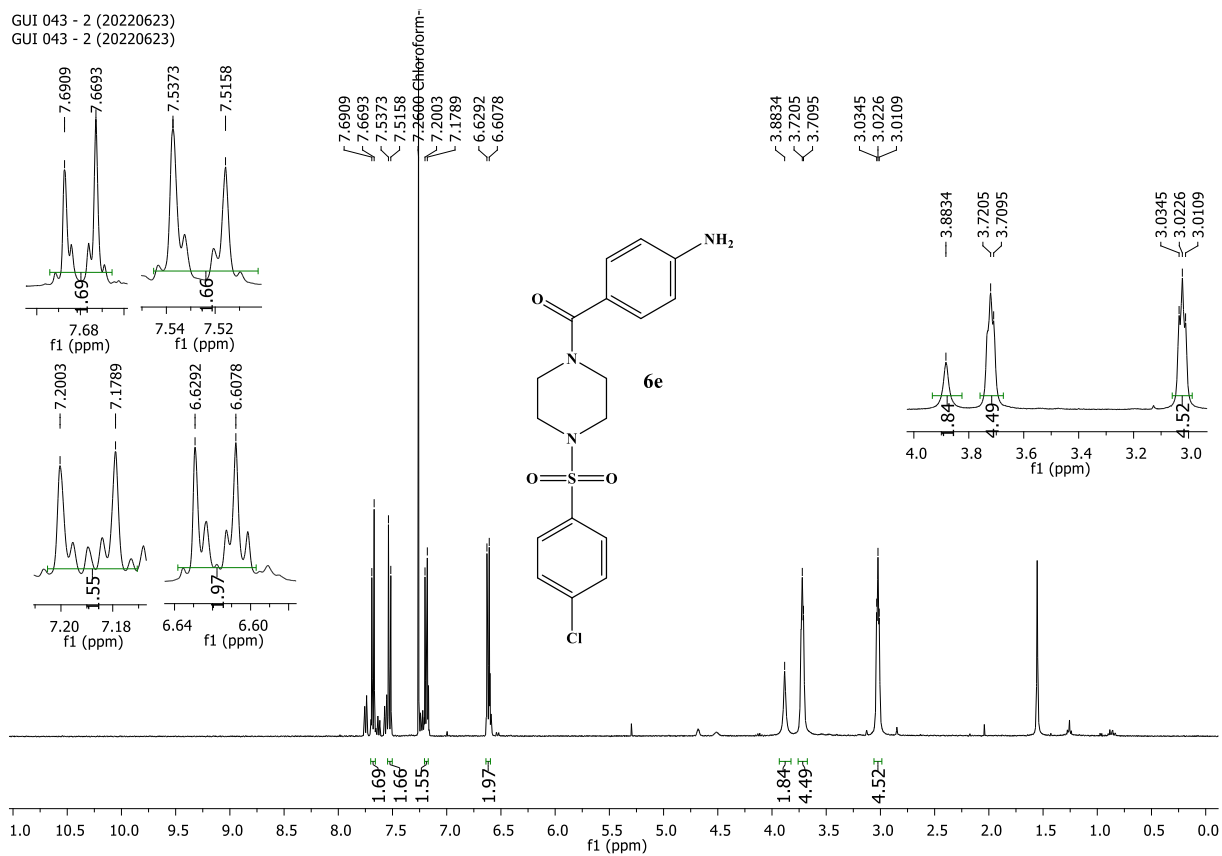
GUI024 (20220323)
GUI024 (20220323)

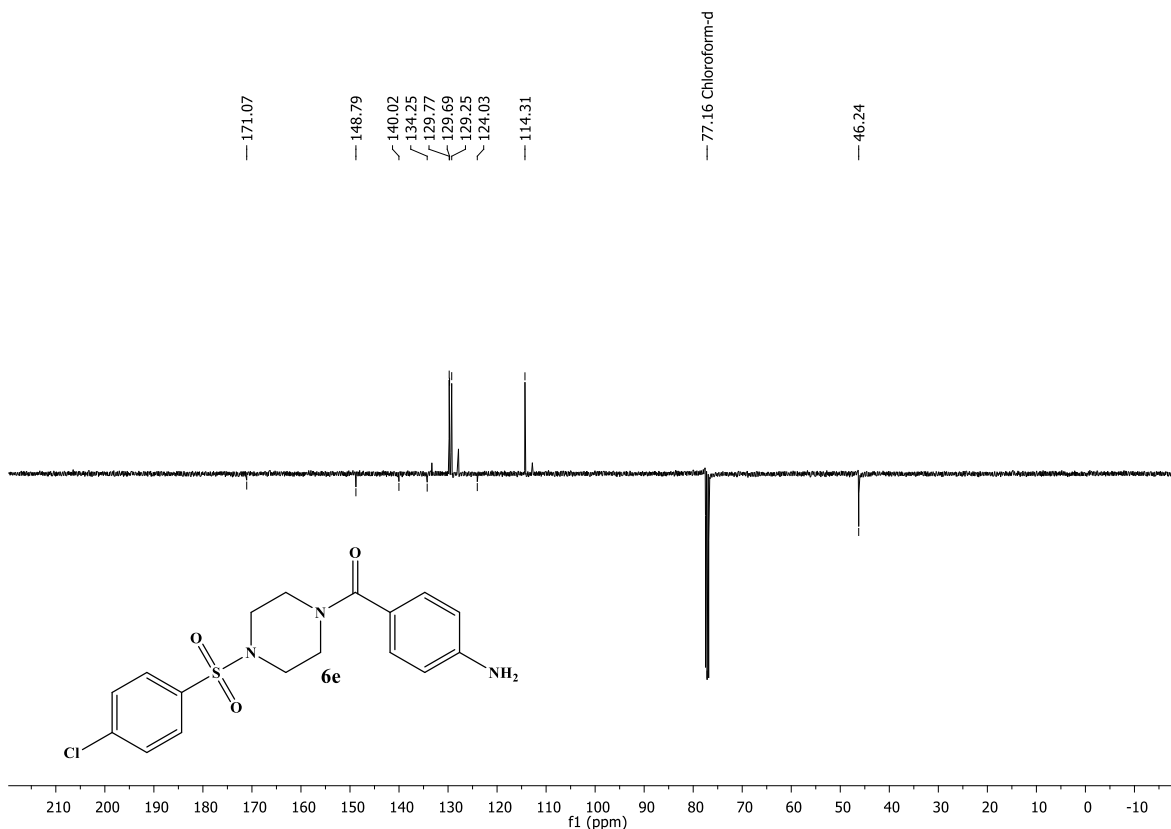
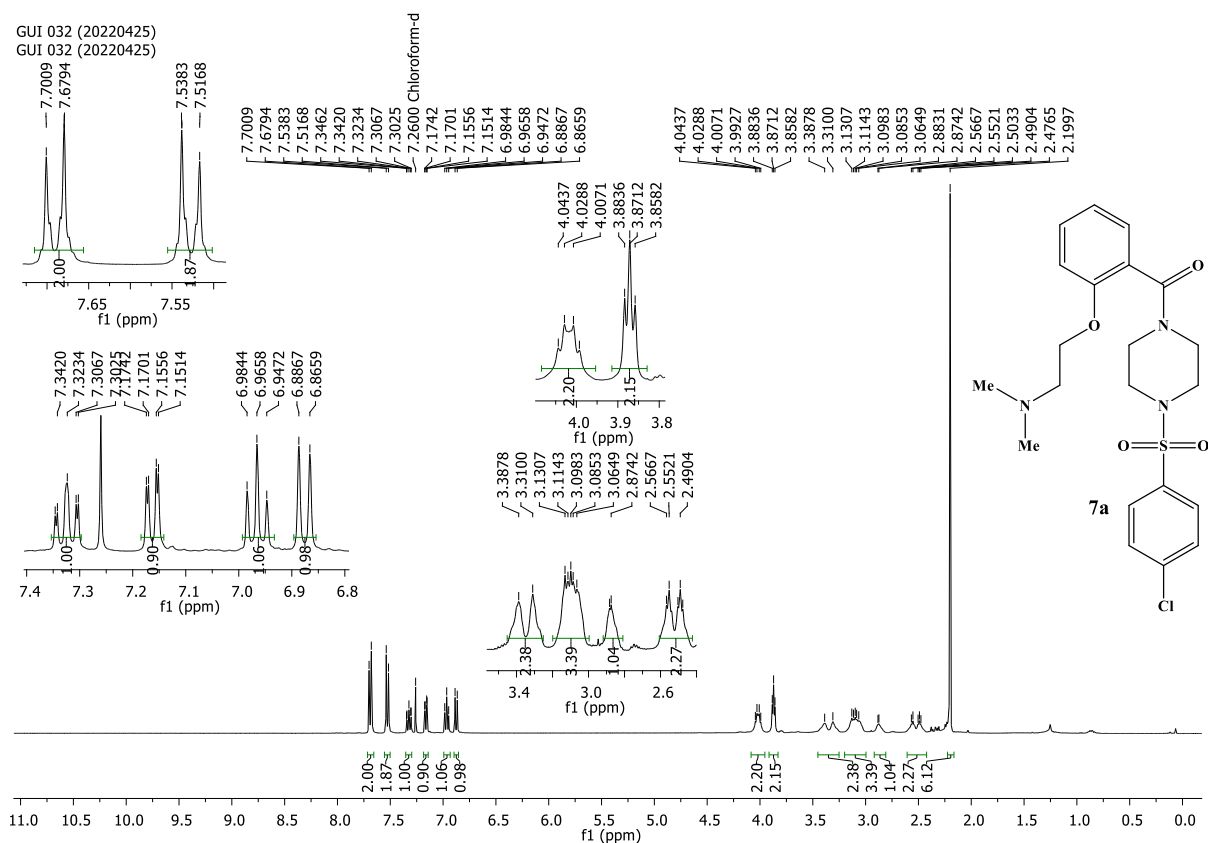


Espectro 6 - RMN de ^1H do composto **6a**.Espectro 7 - RMN de ^{13}C do composto **6a**

Espectro 8 - RMN de ^1H do composto **6b**Espectro 9 - RMN de ^{13}C do composto **6b**

Espectro 10 - RMN de ^1H do composto **6c**Espectro 11 - RMN de ^1H do composto **6d**

Espectro 12 - RMN de ^{13}C do composto **6d**Espectro 13 - RMN de ^1H do composto **6e**

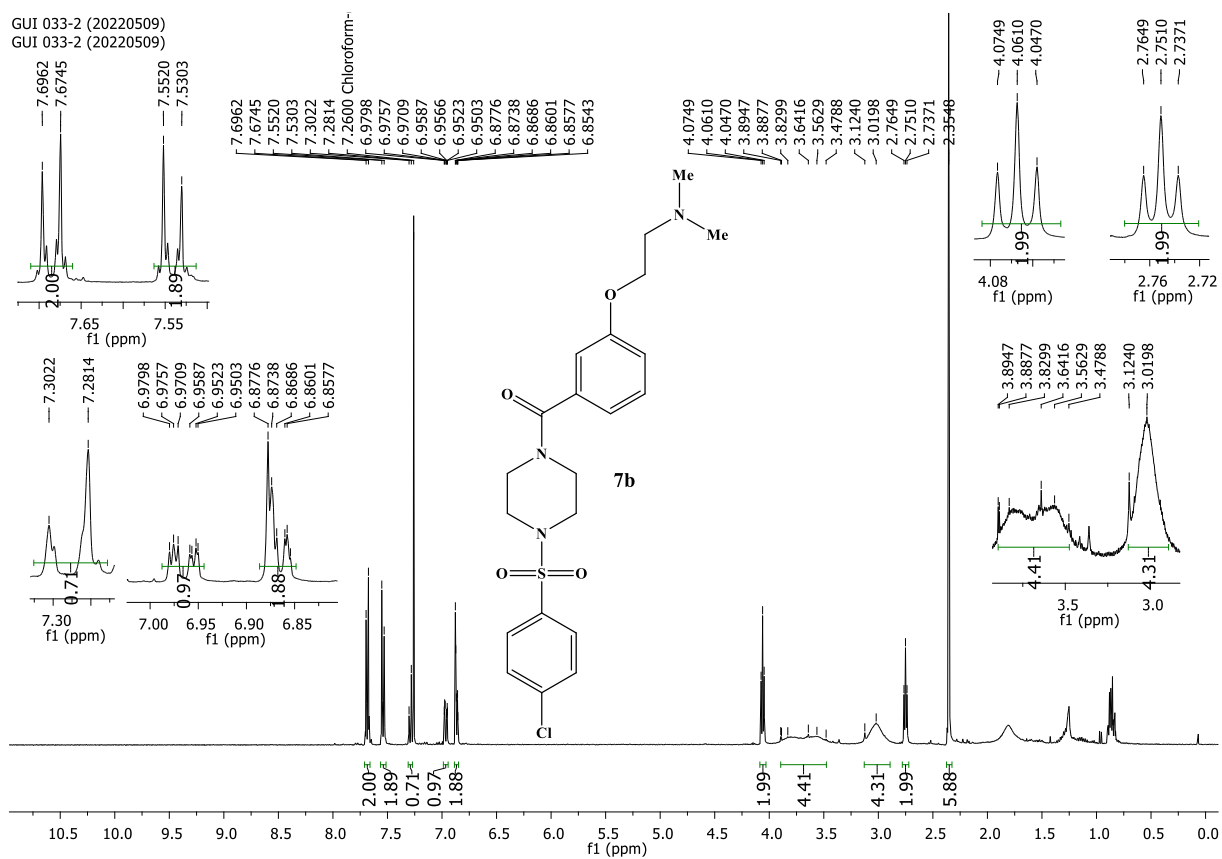
Espectro 14 - RMN de ^{13}C do composto **6e**Espectro 15 - RMN de ^1H do composto **7a**

GUI 032-2 (20220503)
GUI 032-2 (20220503)

Chemical structure of **7a**: CN(C)CCOC(=O)c1ccccc1N2CCN(S(=O)(=O)c3ccc(Cl)cc3)CC2

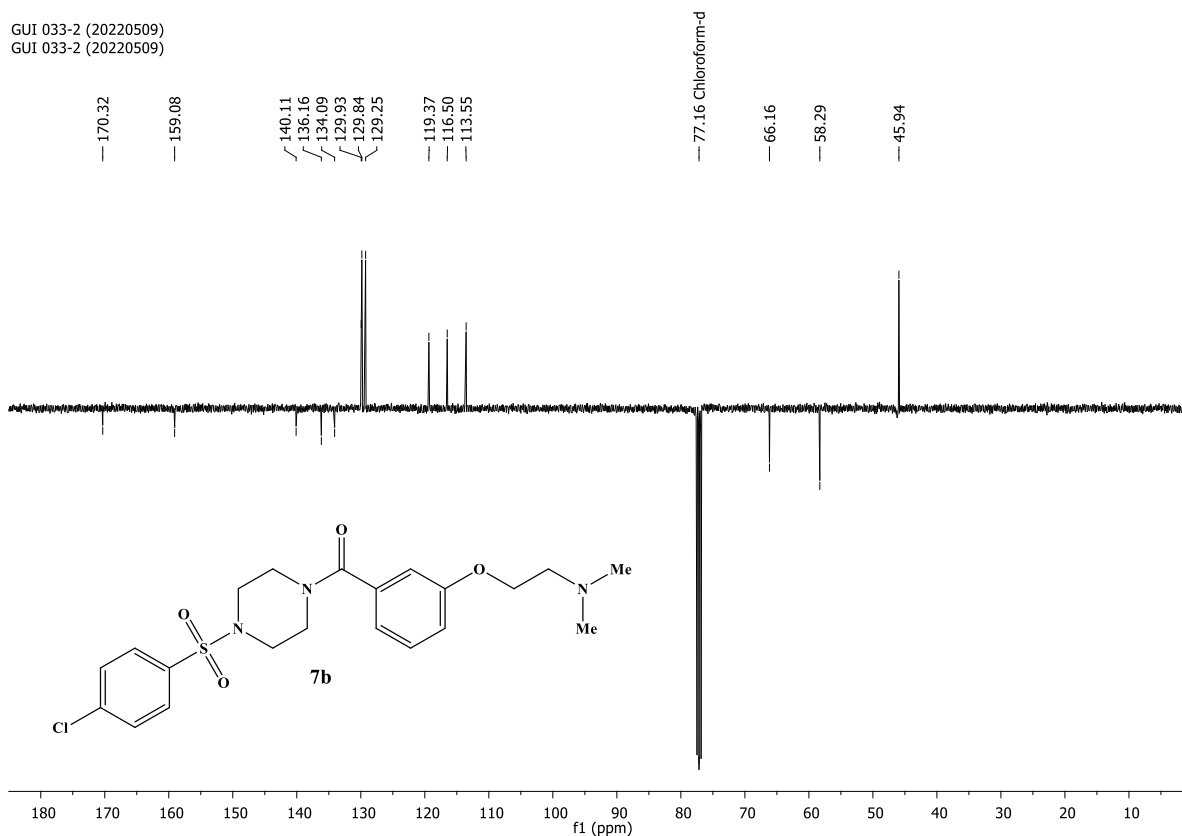
¹³C NMR peaks (ppm): 167.94, 154.52, 139.96, 134.42, 131.02, 129.74, 129.24, 128.26, 125.33, 121.53, 112.37, 77.16 (CDCl₃), 67.34, 58.08, 46.30, 46.07, 45.98, 41.03.

GUI 033-2 (20220509)
GUI 033-2 (20220509)

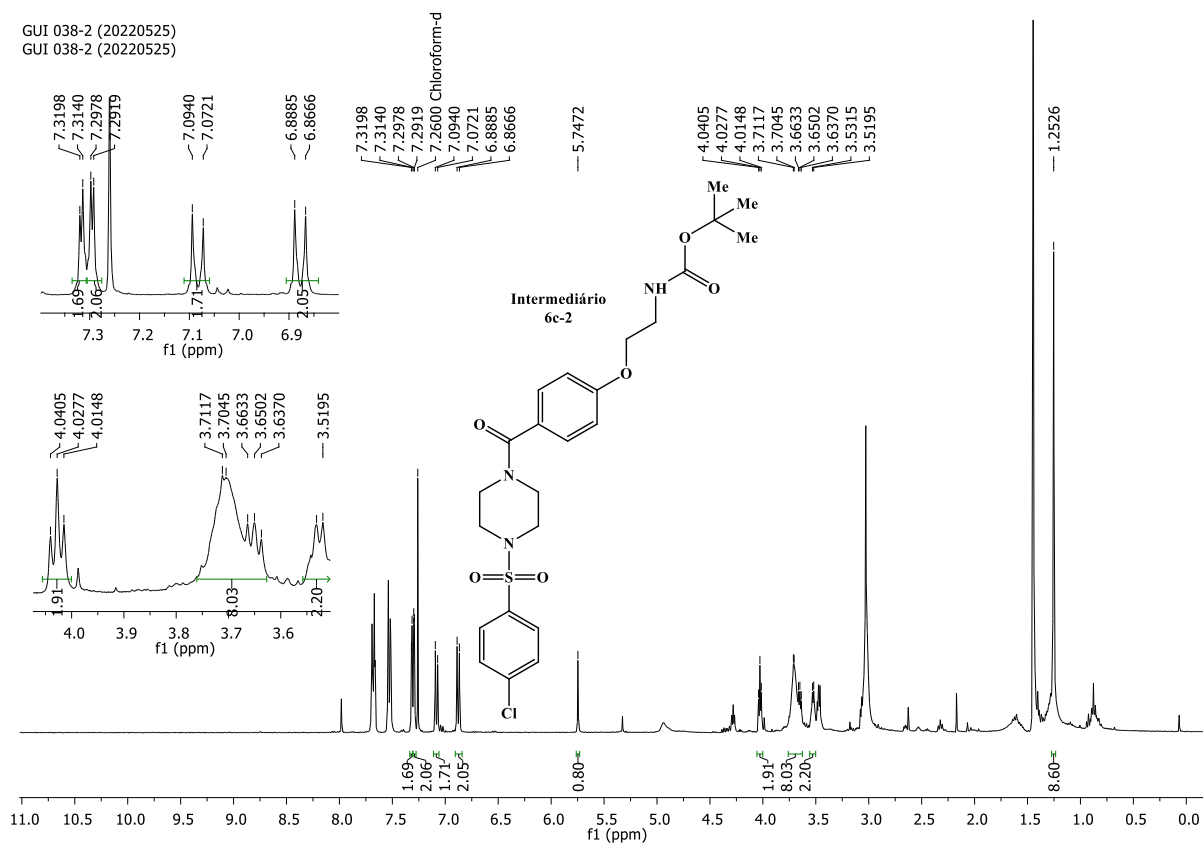


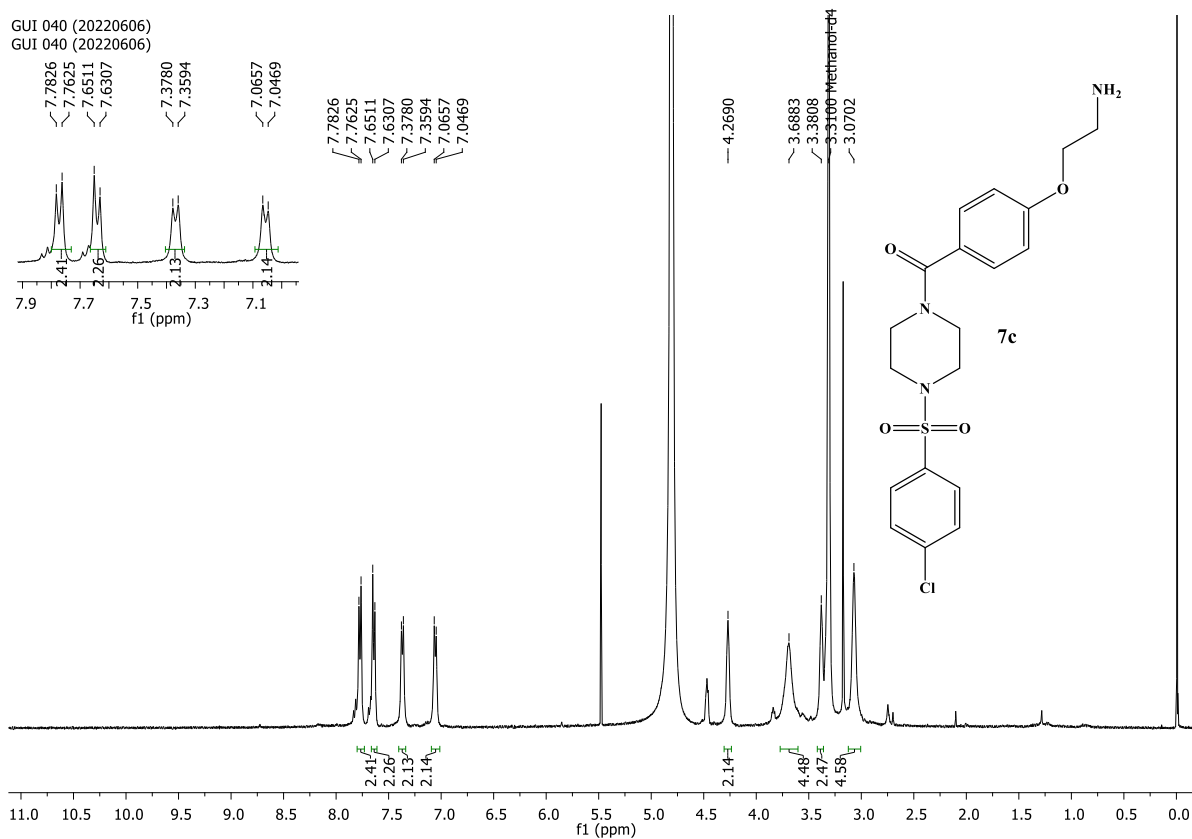
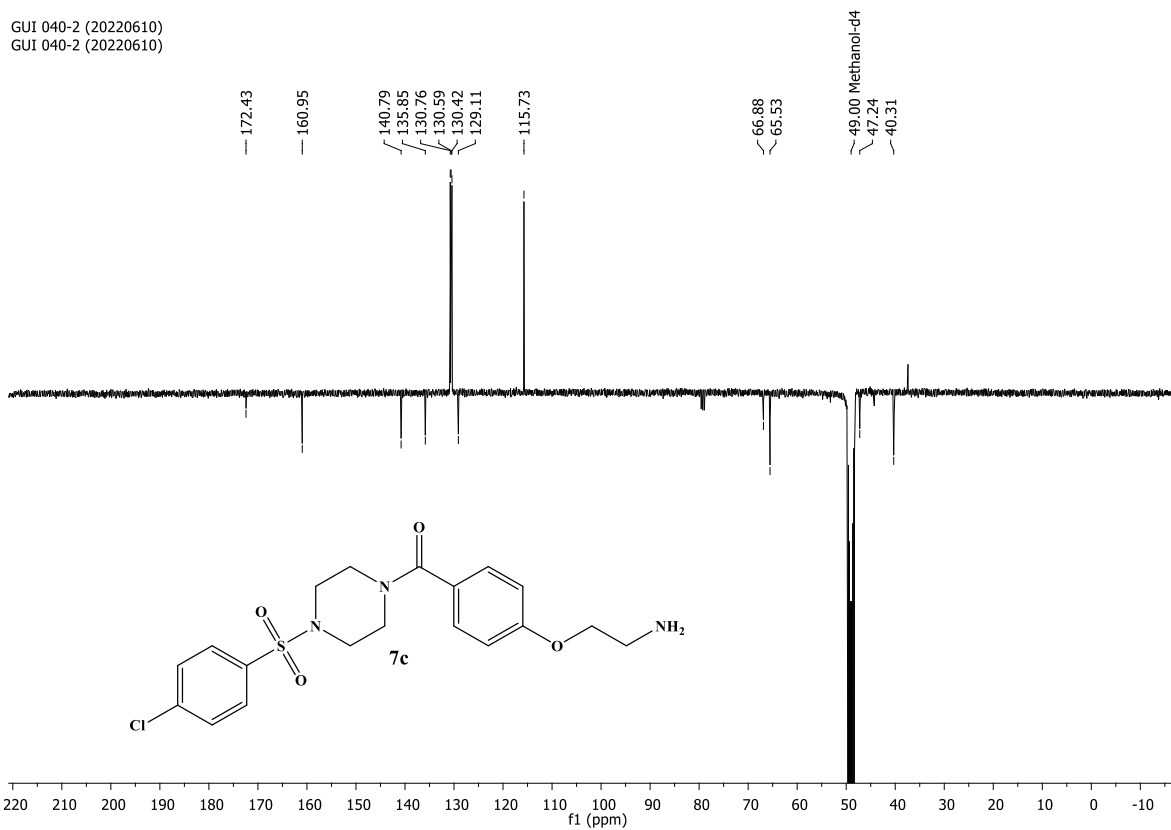
Espectro 18 - RMN de ^{13}C do composto **7b**

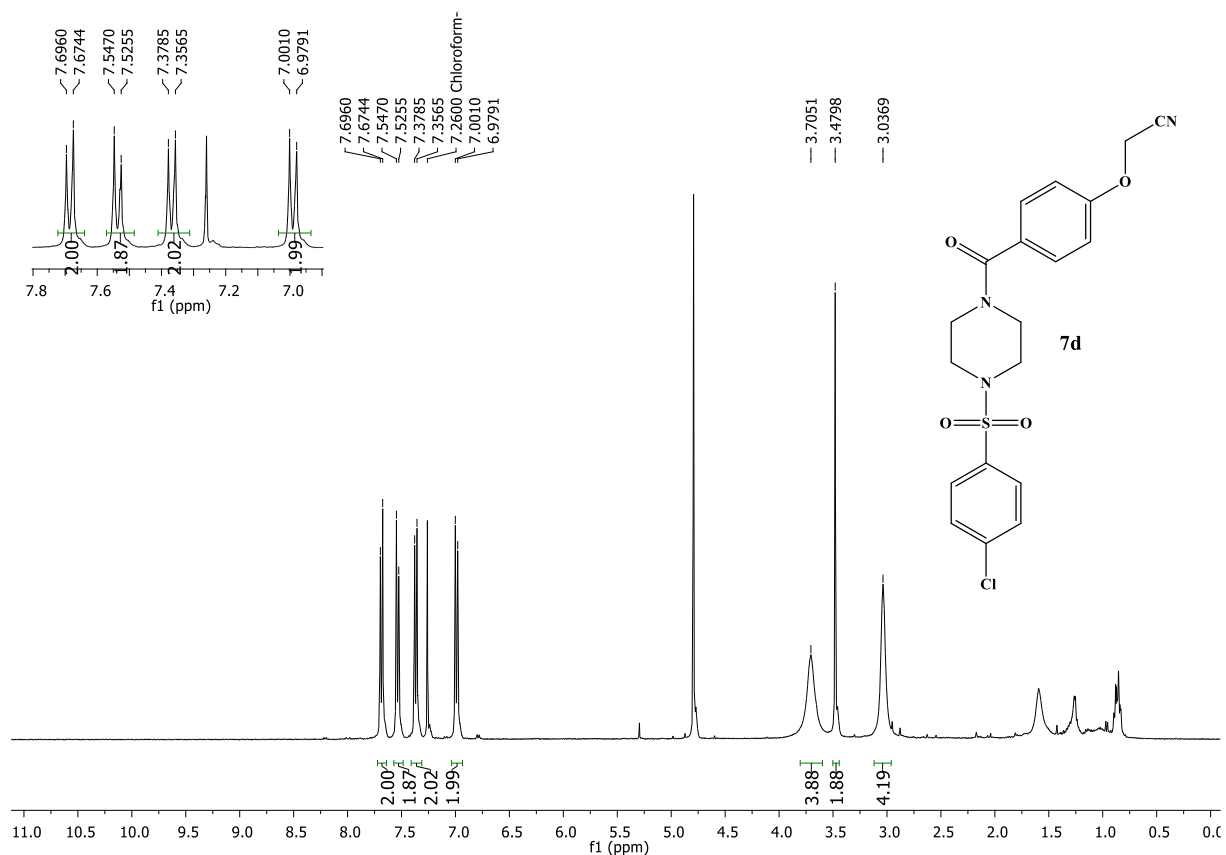
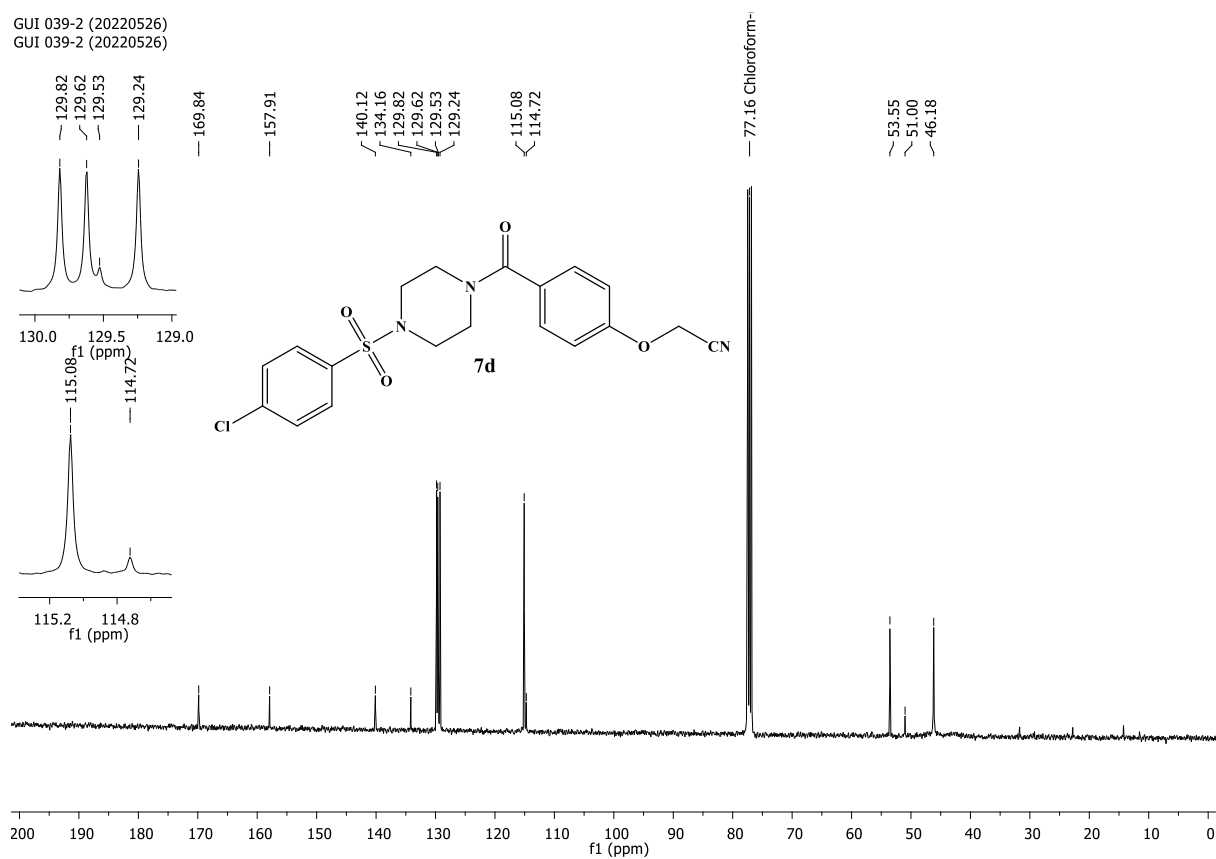
GUI 033-2 (20220509)
GUI 033-2 (20220509)

Espectro 19 - RMN de ^1H do composto **Intermediário 6c-2**

GUI 038-2 (20220525)
GUI 038-2 (20220525)

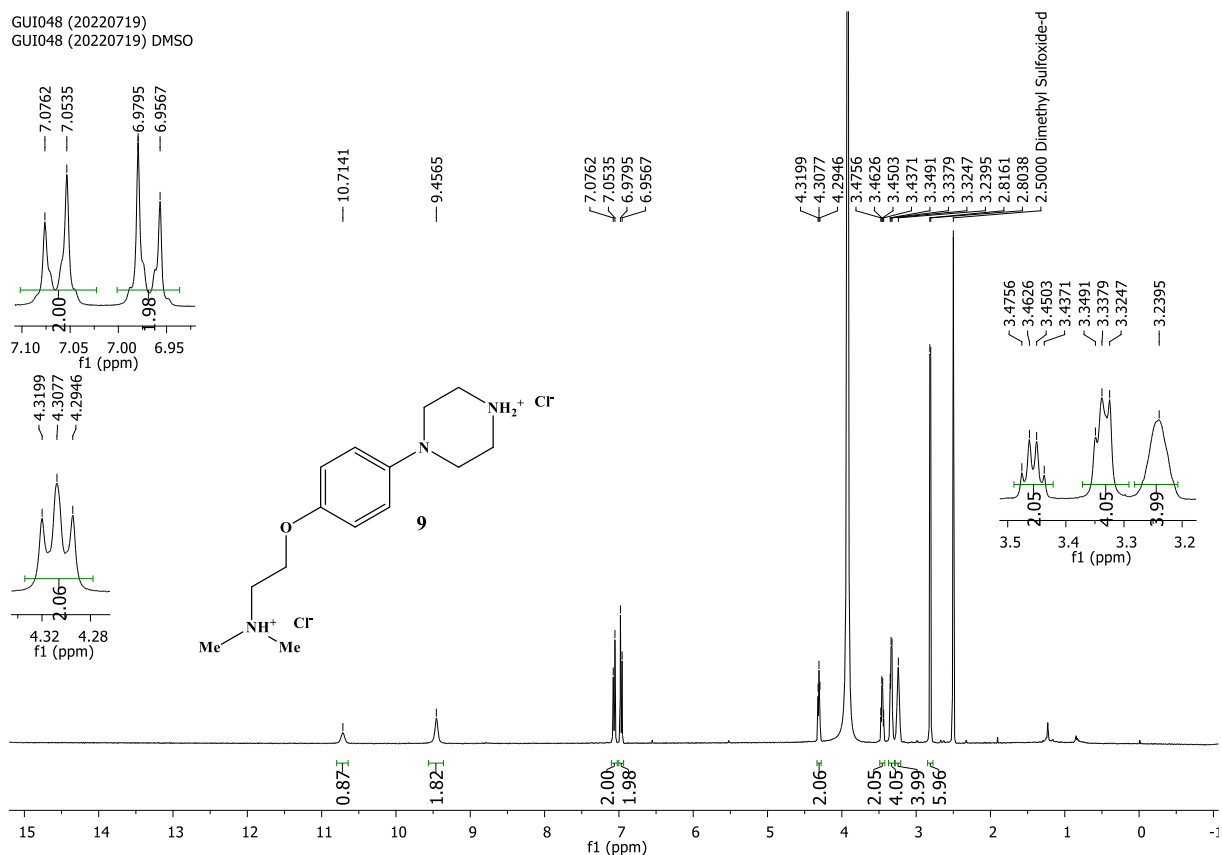


Espectro 20 - RMN de ^1H do composto **7c**Espectro 21 - RMN de ^{13}C do composto **7c**

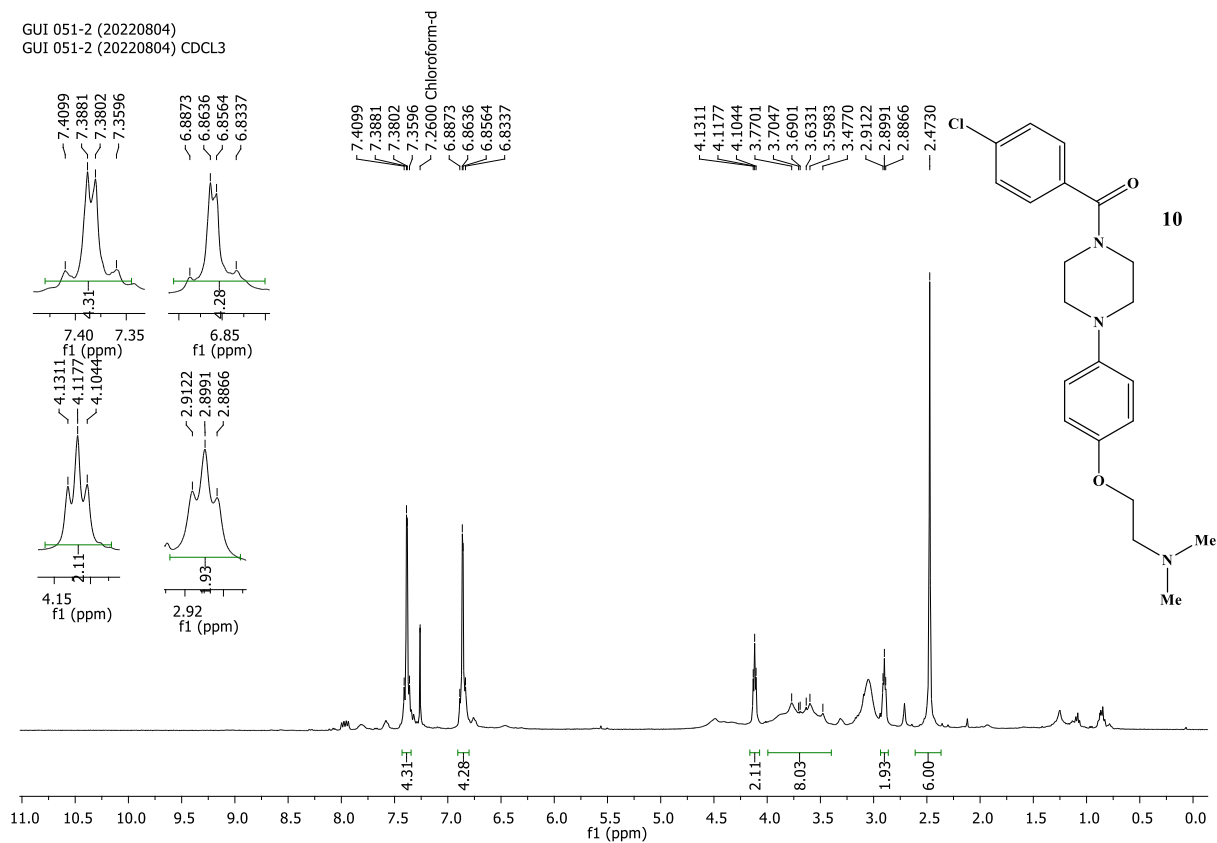
Espectro 22 - RMN de ^1H do composto **7d**Espectro 23 - RMN de ^{13}C do composto **7d**

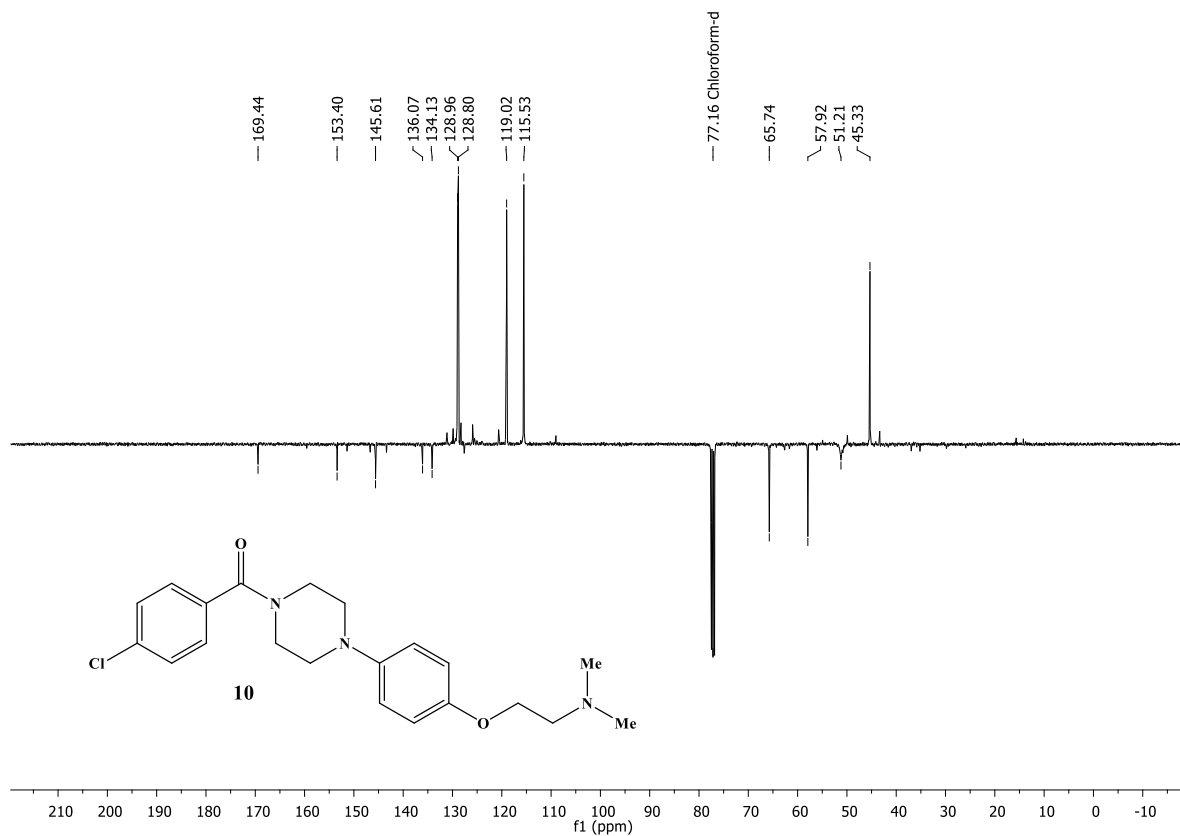
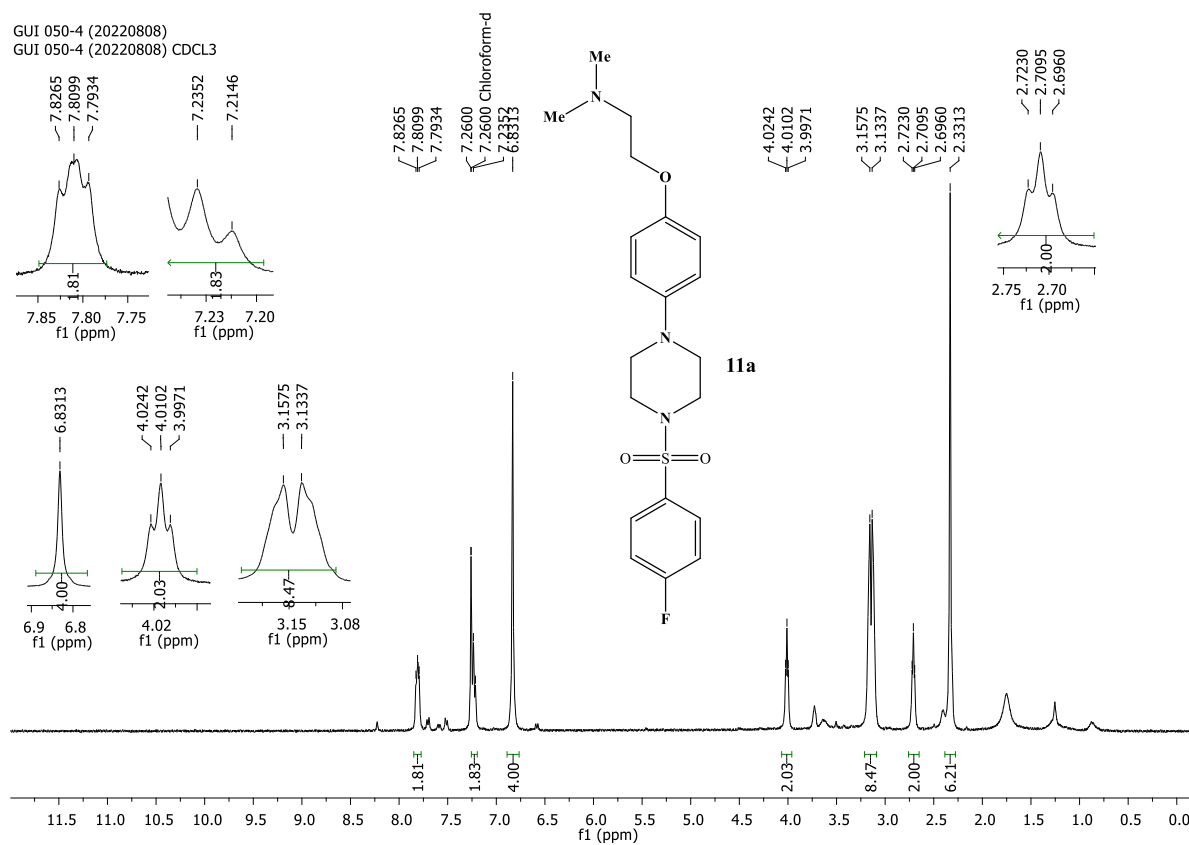
Espectro 24 - RMN de ^1H do composto **9**

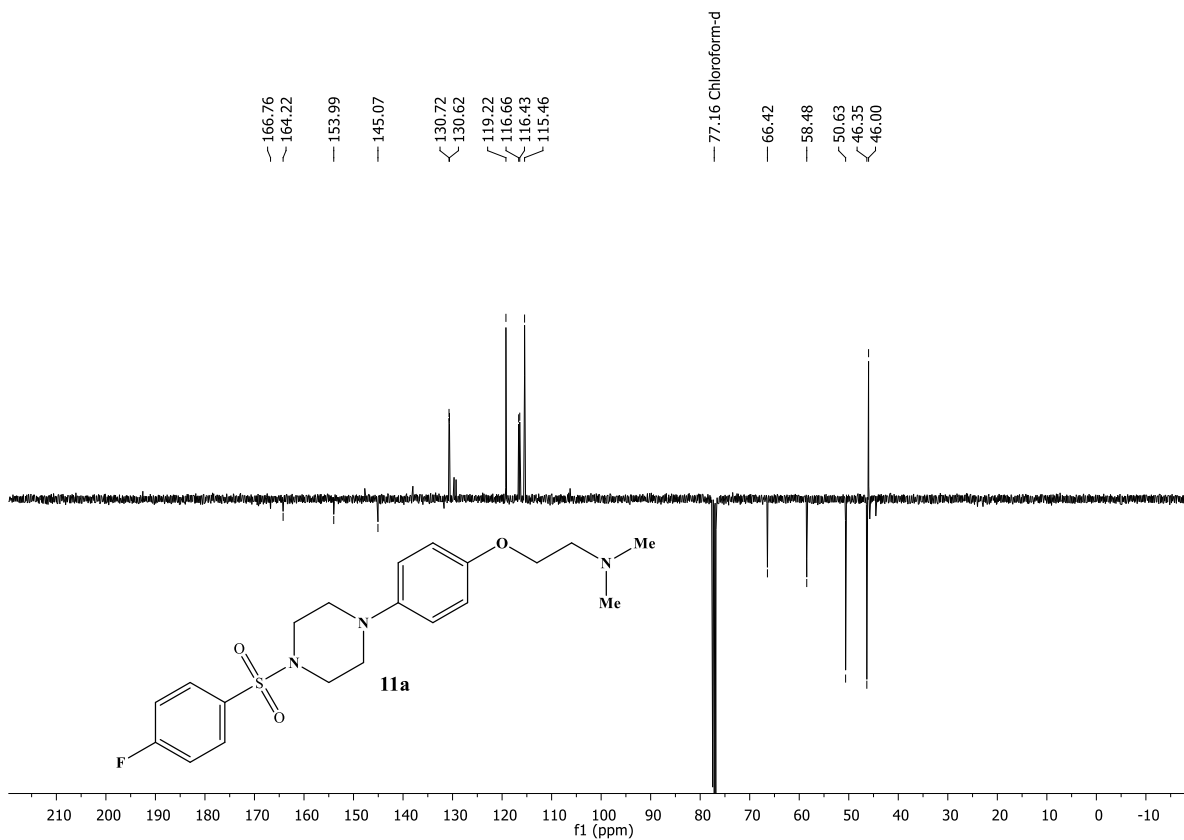
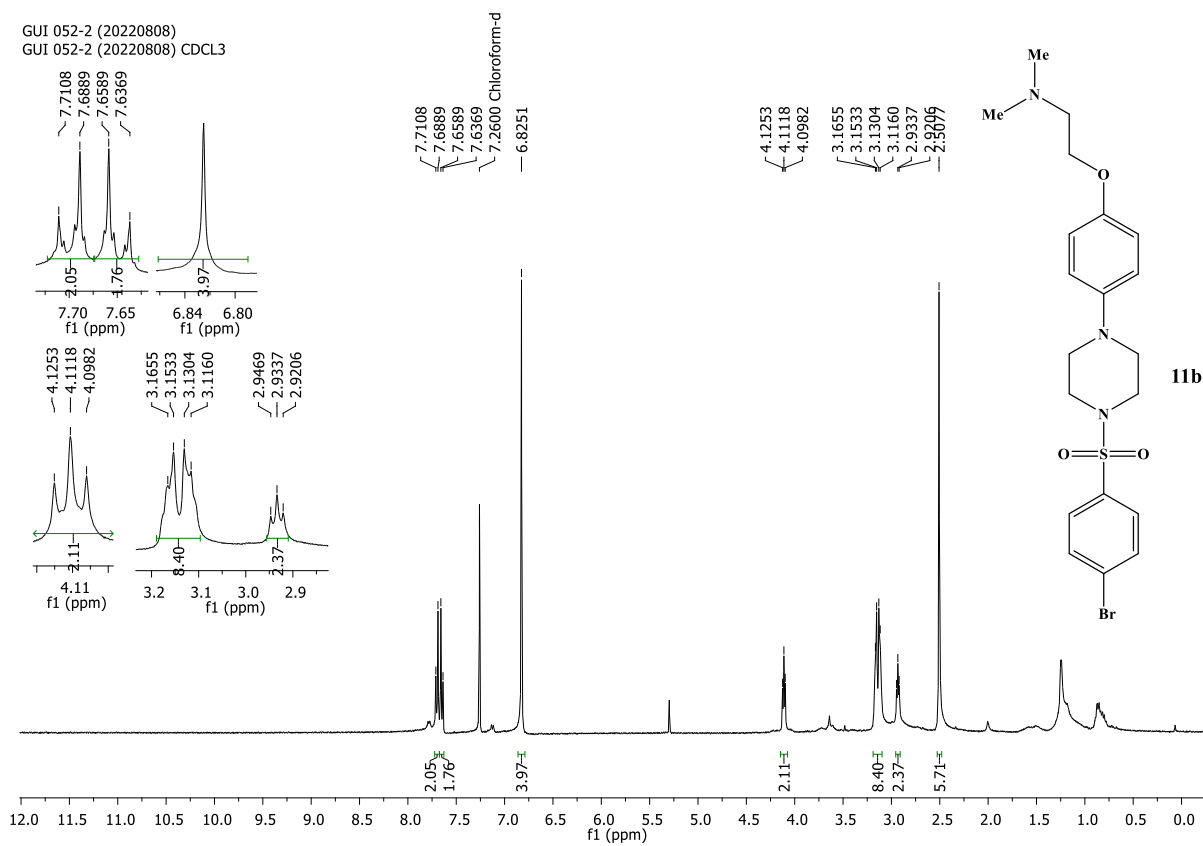
GUI048 (20220719)
GUI048 (20220719) DMSO

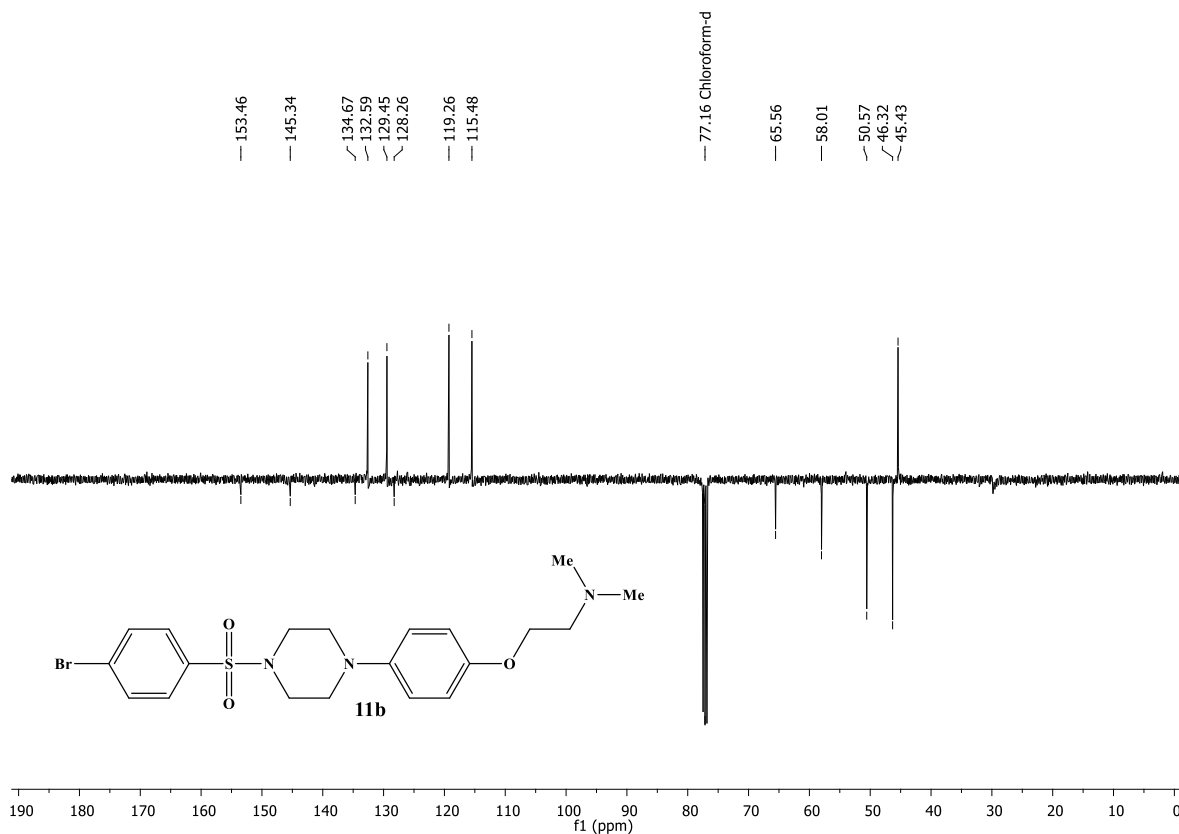
Espectro 25 - RMN de ^1H do composto **10**

GUI 051-2 (20220804)
GUI 051-2 (20220804) CDCl₃

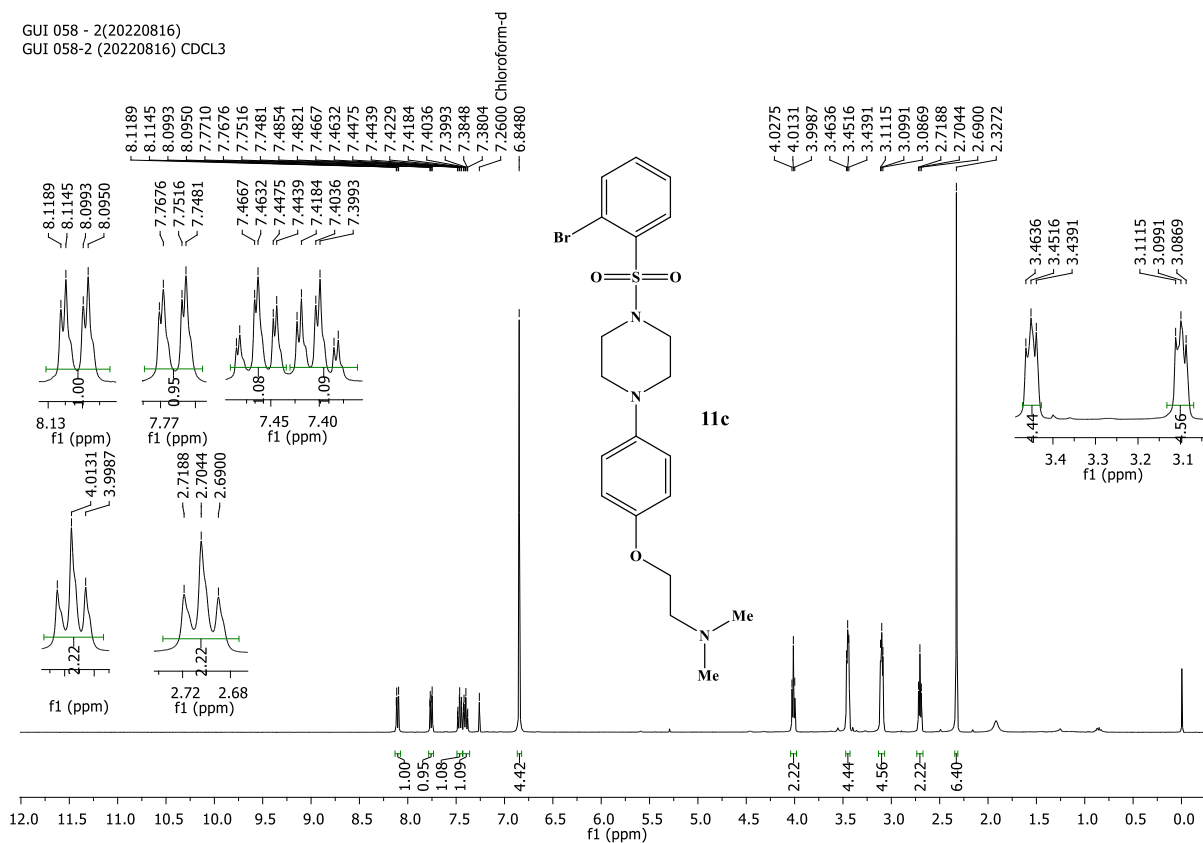


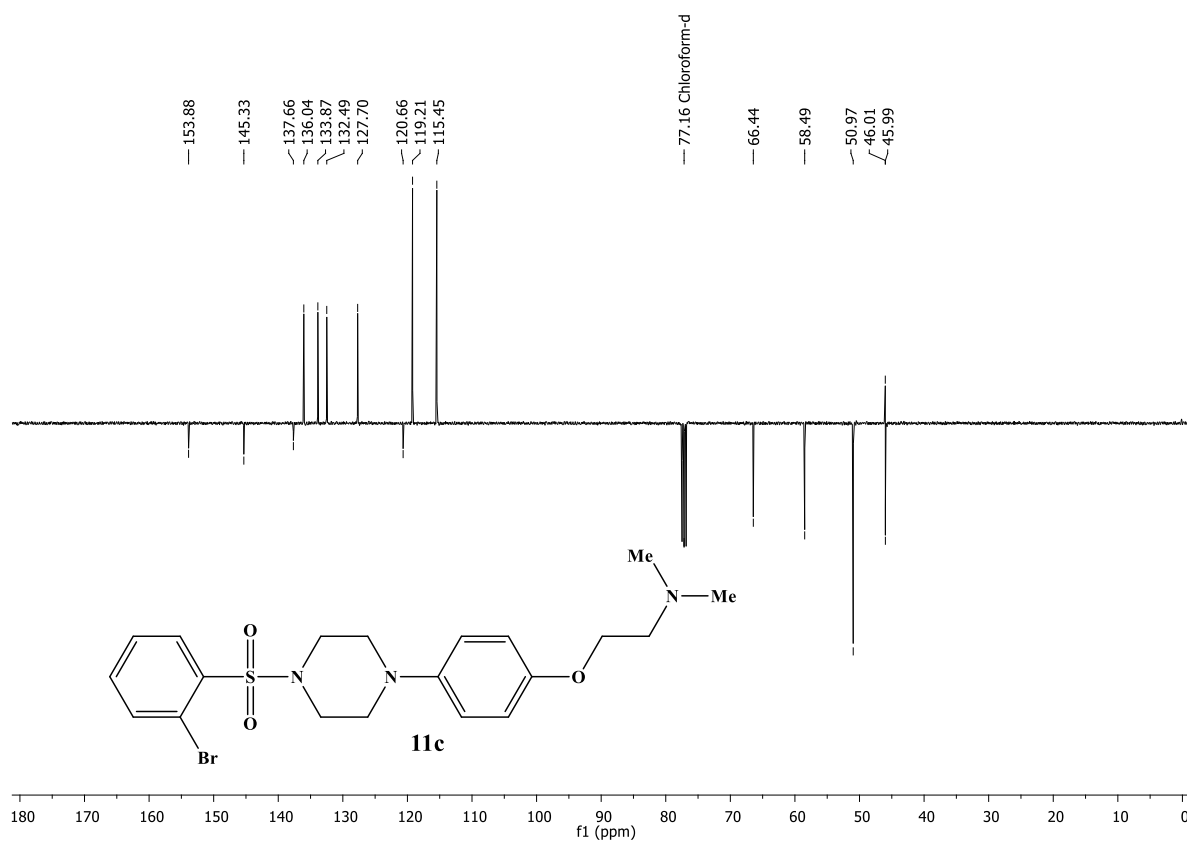
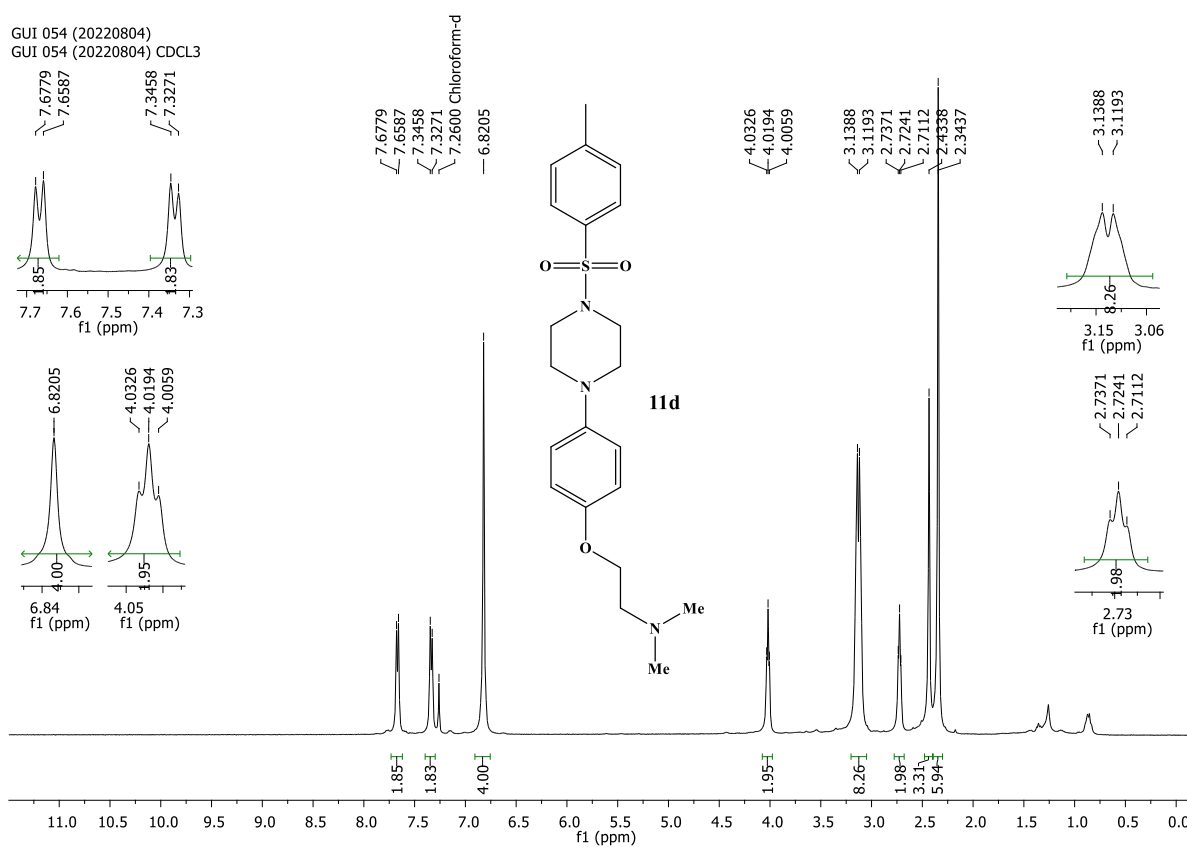
Espectro 26 - RMN de ^{13}C do composto **10**Espectro 27 - RMN de ^1H do composto **11a**

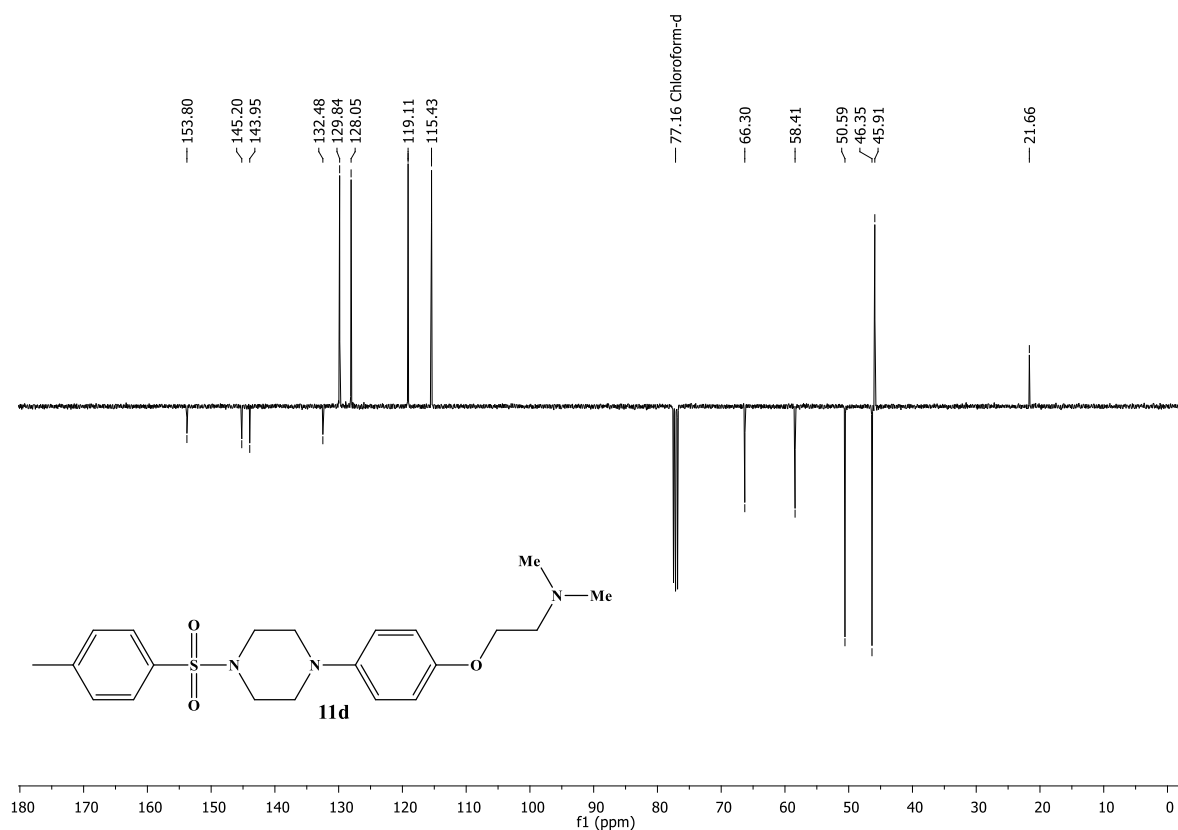
Espectro 28 - RMN de ^{13}C do composto **11a**Espectro 29 - RMN de ^1H do composto **11b**

Espectro 30 - RMN de ^{13}C do composto **11b**Espectro 31 - RMN de ^1H do composto **11c**

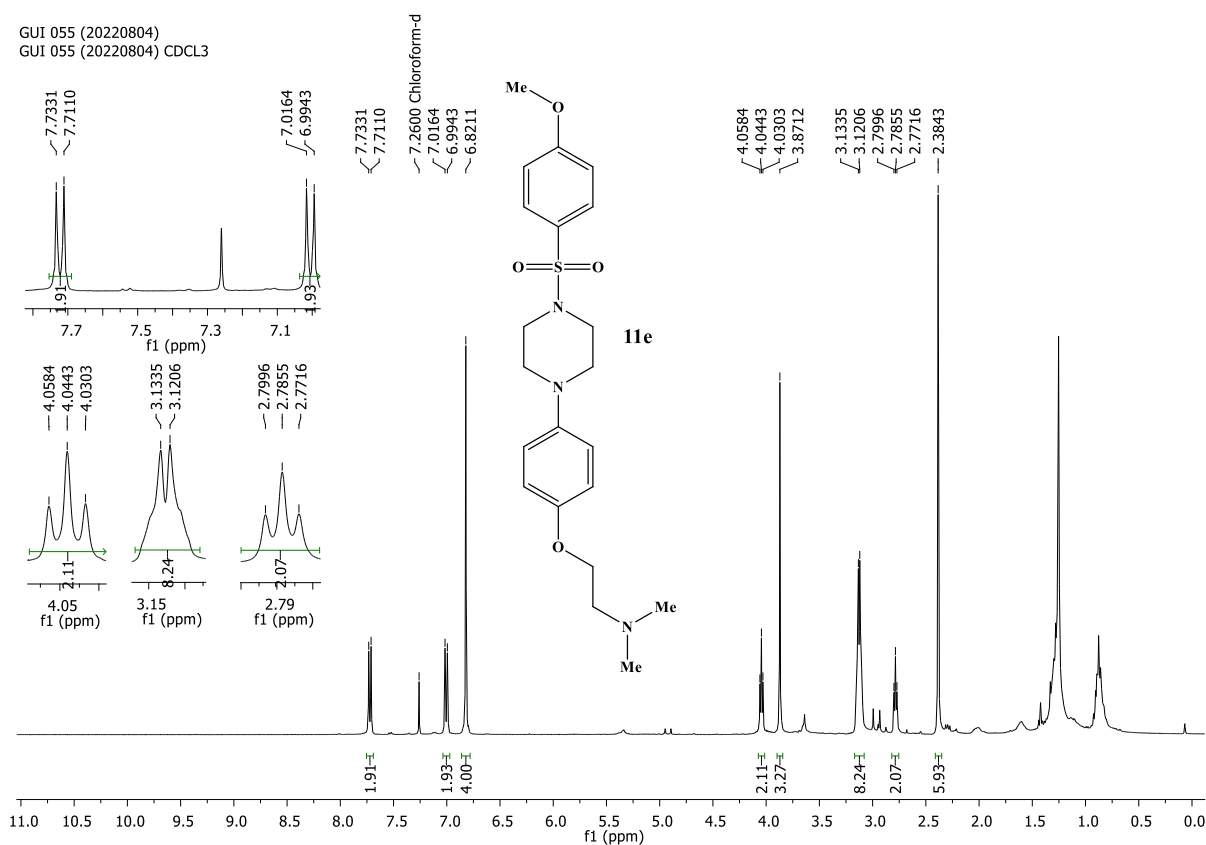
GUI 058 - 2(20220816)
 GUI 058-2 (20220816) CDCl₃

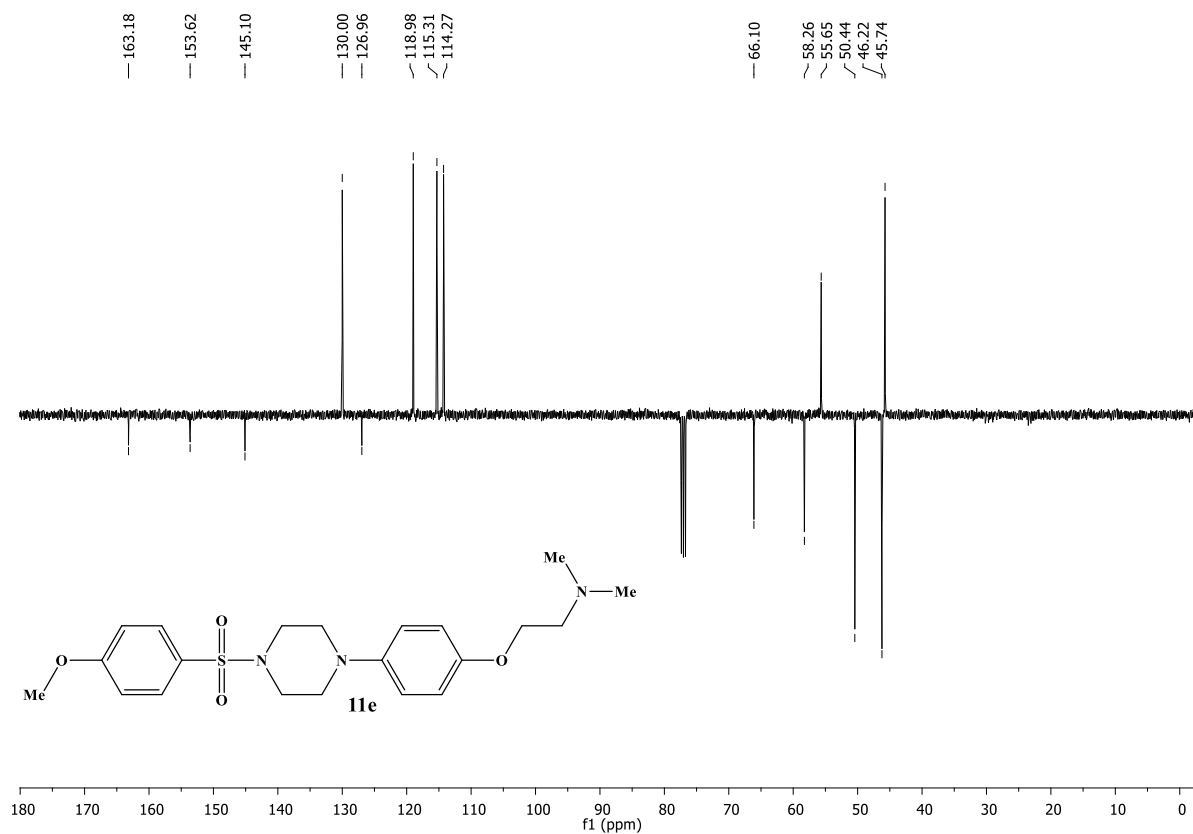
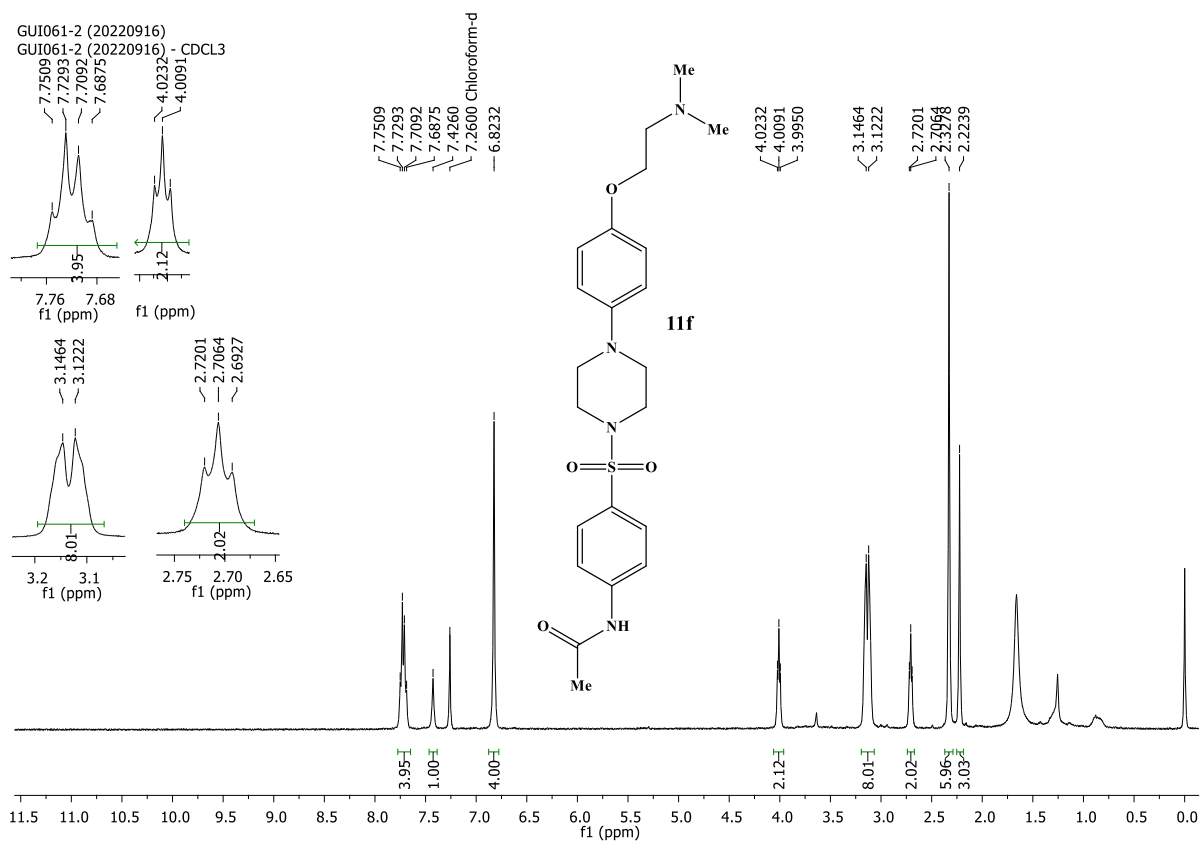


Espectro 32 - RMN de ^{13}C do composto **11c**Espectro 33 - RMN de ^1H do composto **11d**

Espectro 34 - RMN de ^{13}C do composto **11d**Espectro 35 - RMN de ^1H do composto **11e**

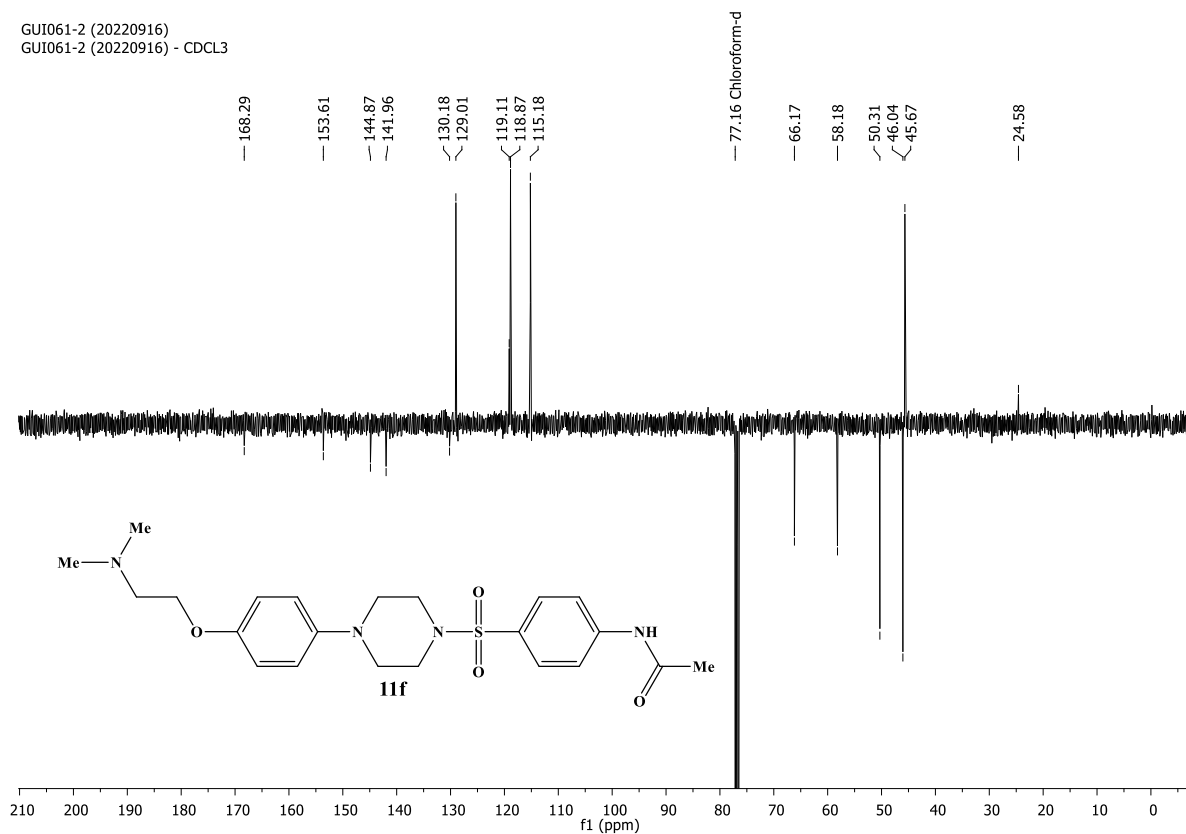
GUI 055 (20220804)
GUI 055 (20220804) CDCL3



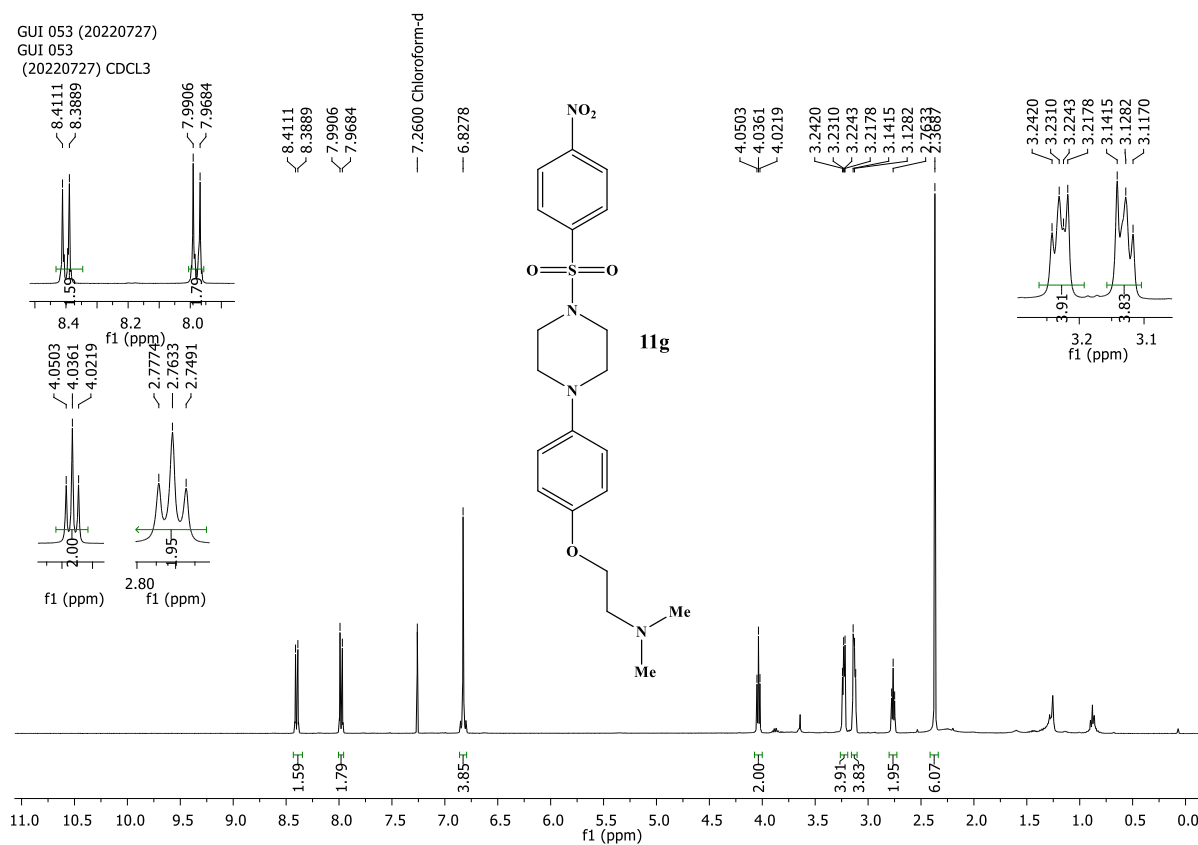
Espectro 36 - RMN de ^{13}C do composto **11e**Espectro 37 - RMN de ^1H do composto **11f**

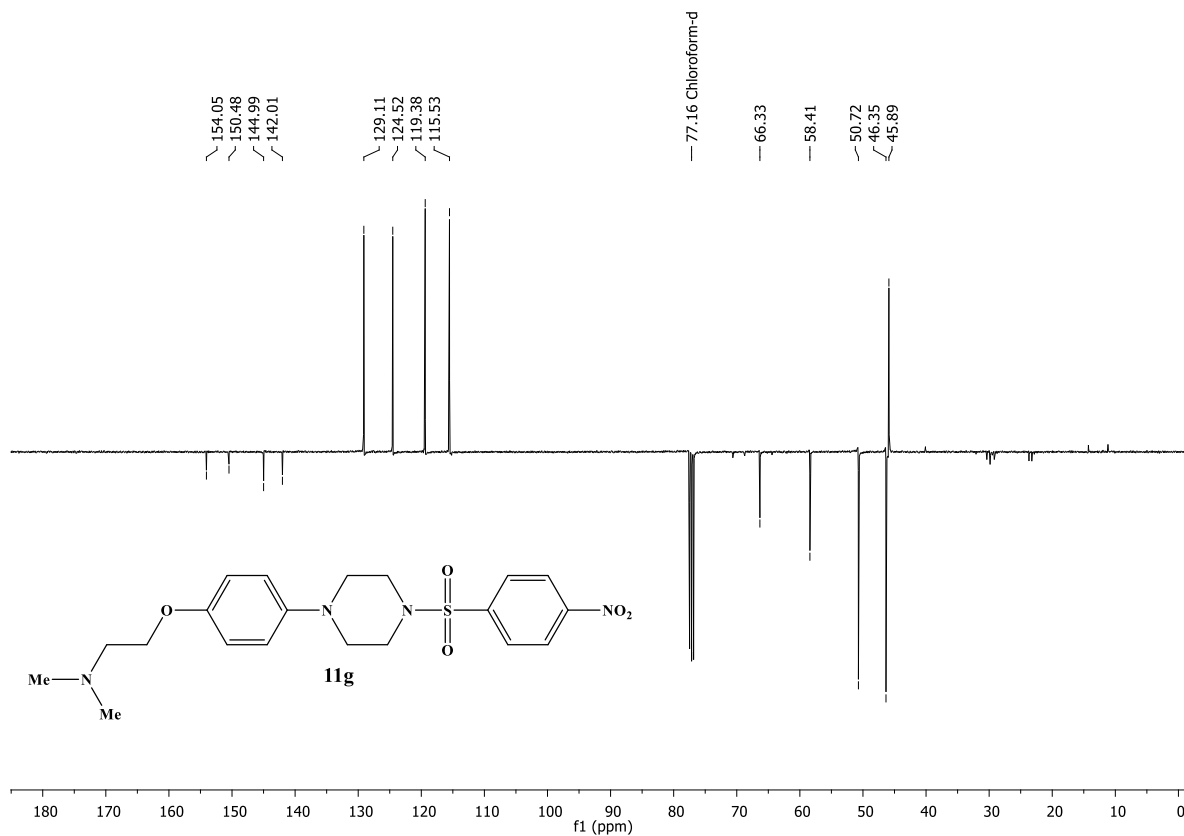
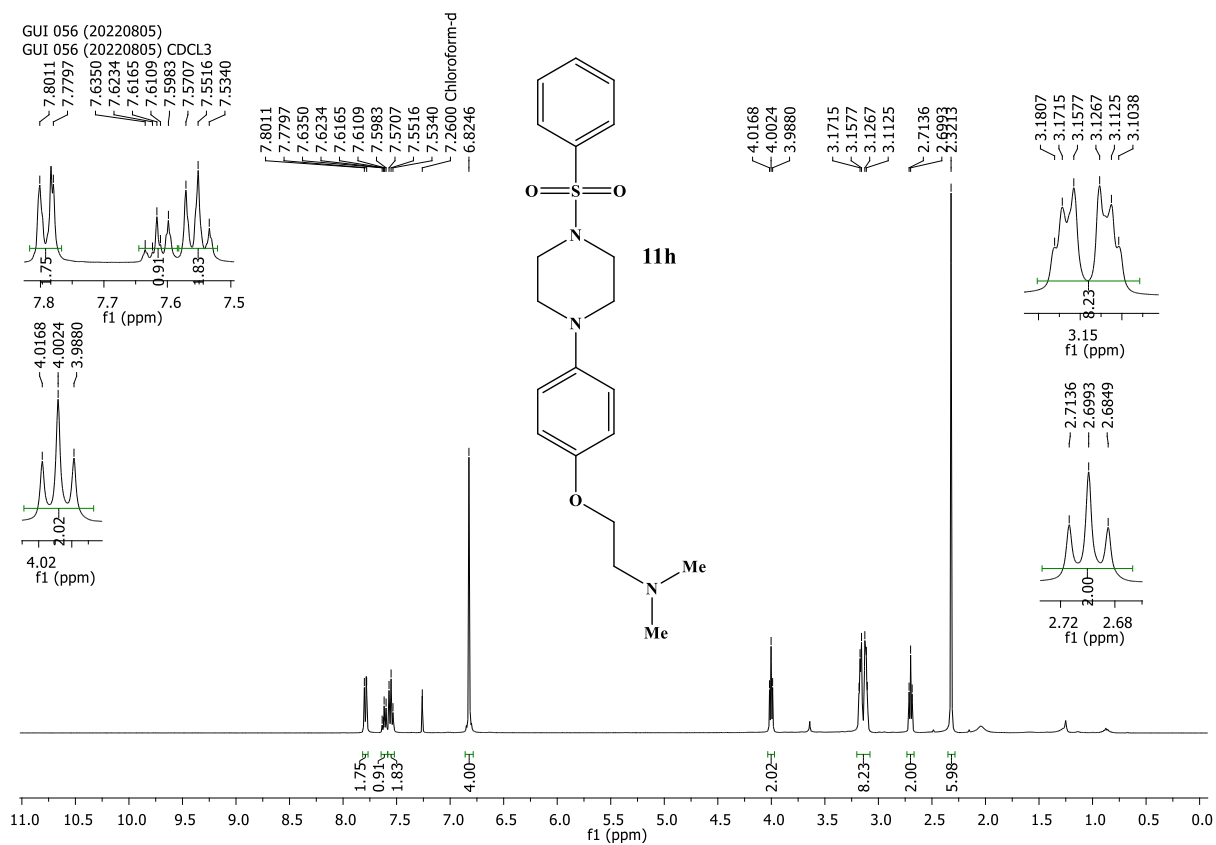
Espectro 38 - RMN de ^{13}C do composto **11f**

GUI061-2 (20220916)
GUI061-2 (20220916) - CDCL₃

Espectro 39 - RMN de ^1H do composto **11g**

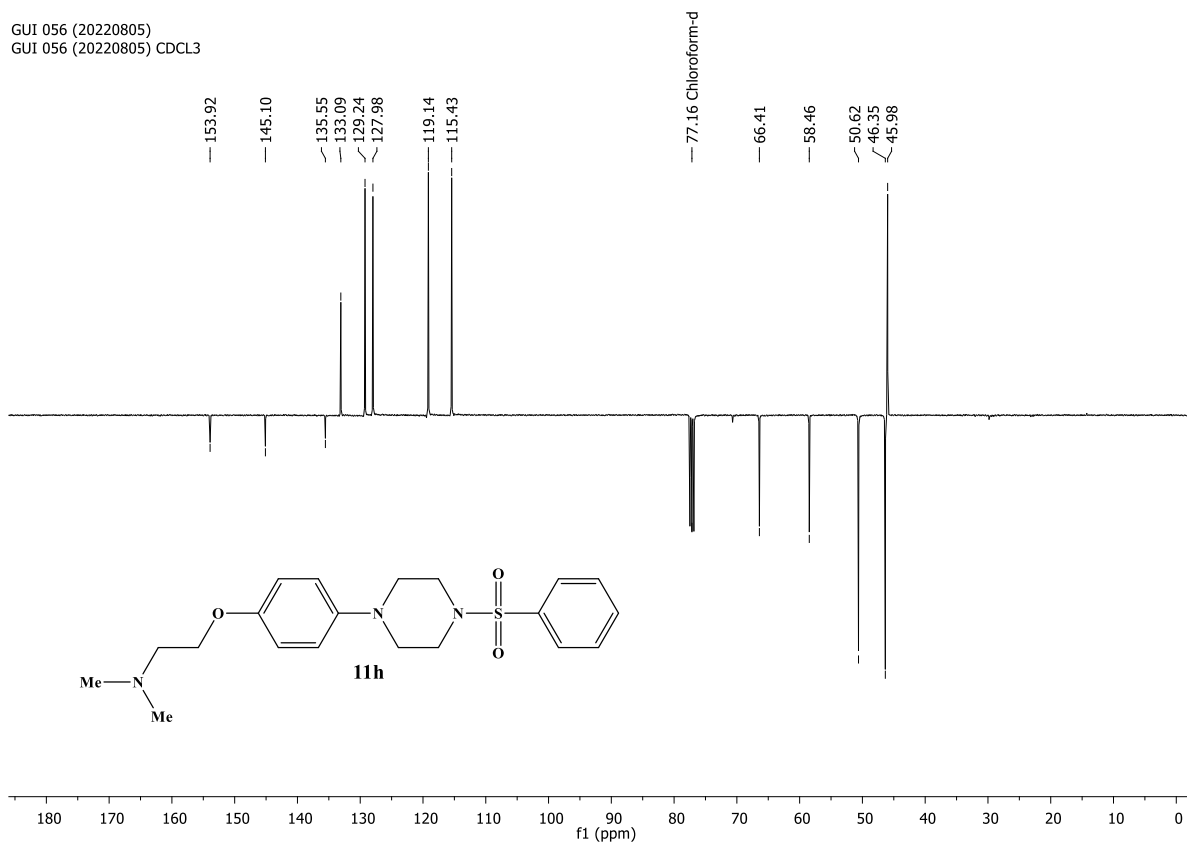
GUI 053 (20220727)
GUI 053
(20220727) CDCL₃



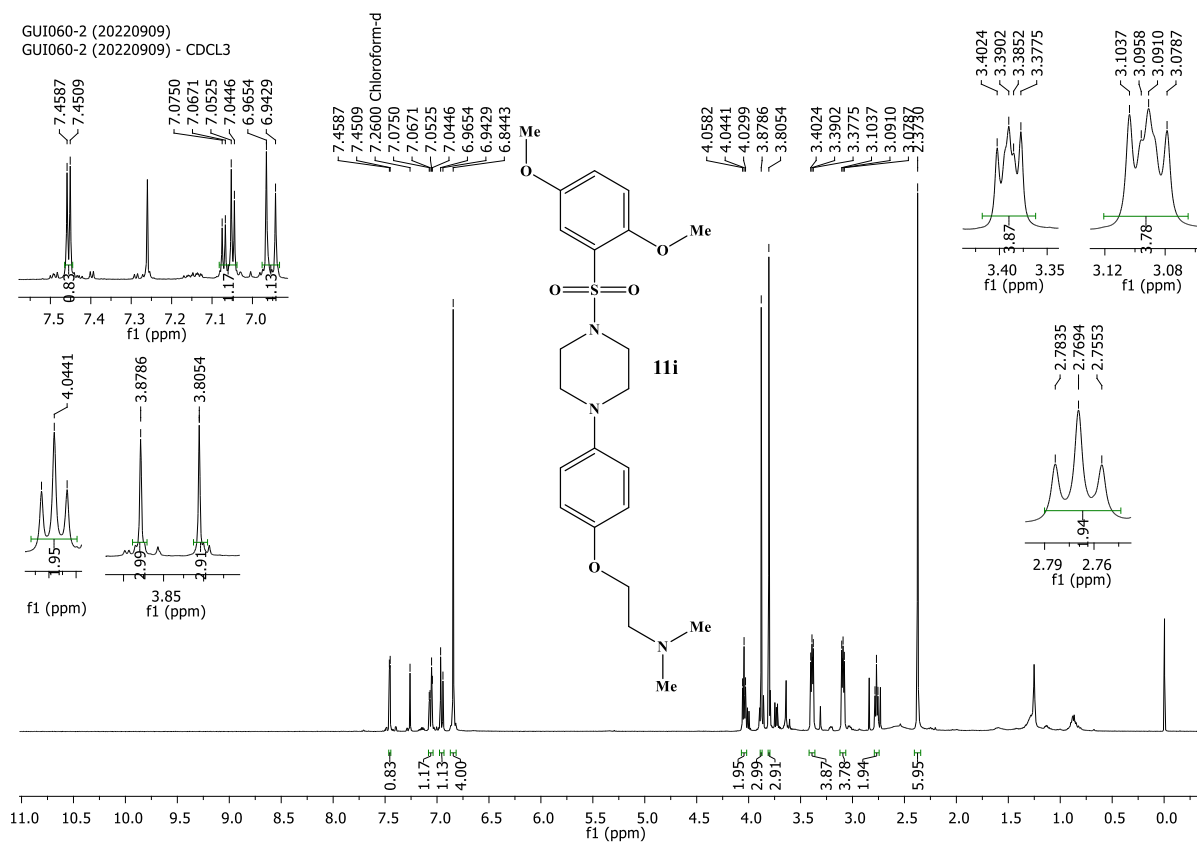
Espectro 40 - RMN de ^{13}C do composto **11g**Espectro 42 - RMN de ^1H do composto **11h**

Espectro 43 - RMN de ^{13}C do composto **11h**

GUI 056 (20220805)
GUI 056 (20220805) CDCL₃

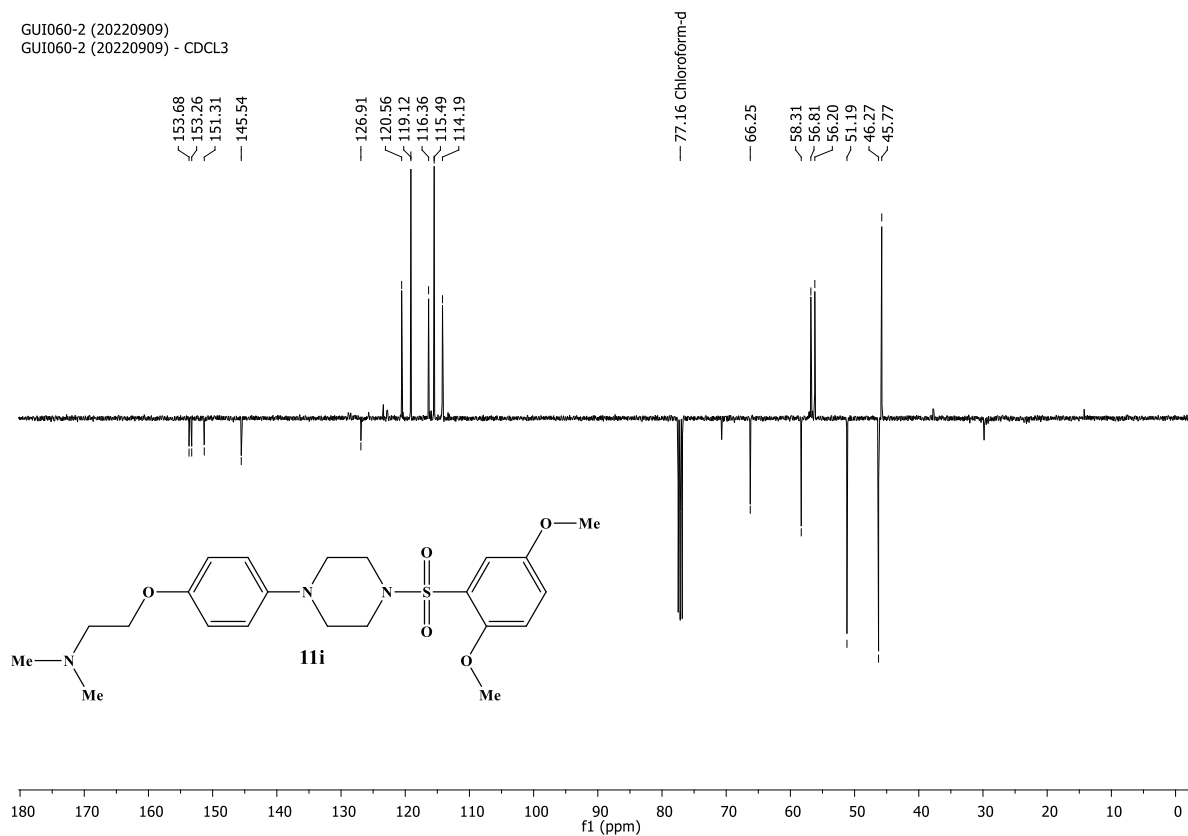
Espectro 44 - RMN de ^1H do composto **11i**

GUI060-2 (20220909)
GUI060-2 (20220909) - CDCL₃

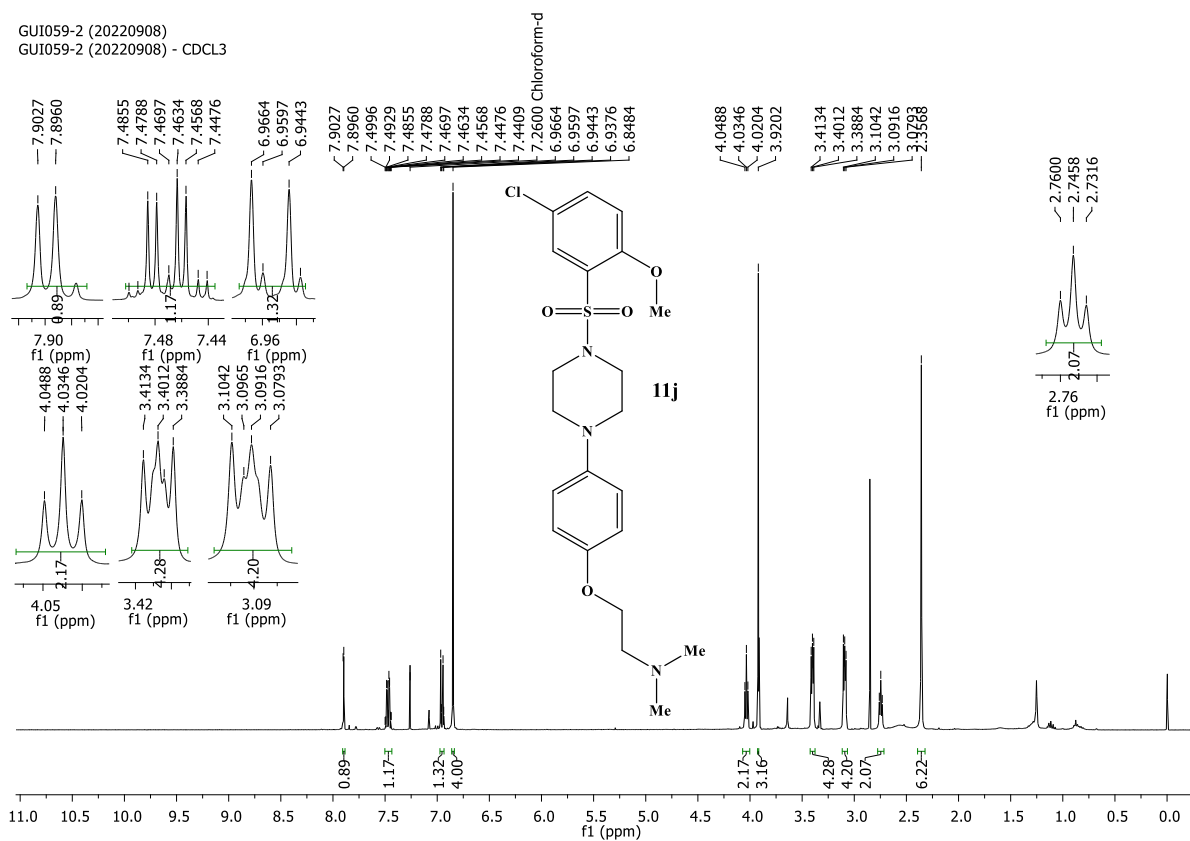


Espectro 45 - RMN de ^{13}C do composto **11i**

GUI060-2 (20220909)
 GUI060-2 (20220909) - CDCL₃

Espectro 46 - RMN de ^1H do composto **11j**

GUI059-2 (20220908)
 GUI059-2 (20220908) - CDCL₃



GUI059-2 (20220908)
GUI059-2 (20220908) - CDCL₃

Chemical structure of **11j** is shown below the spectrum:

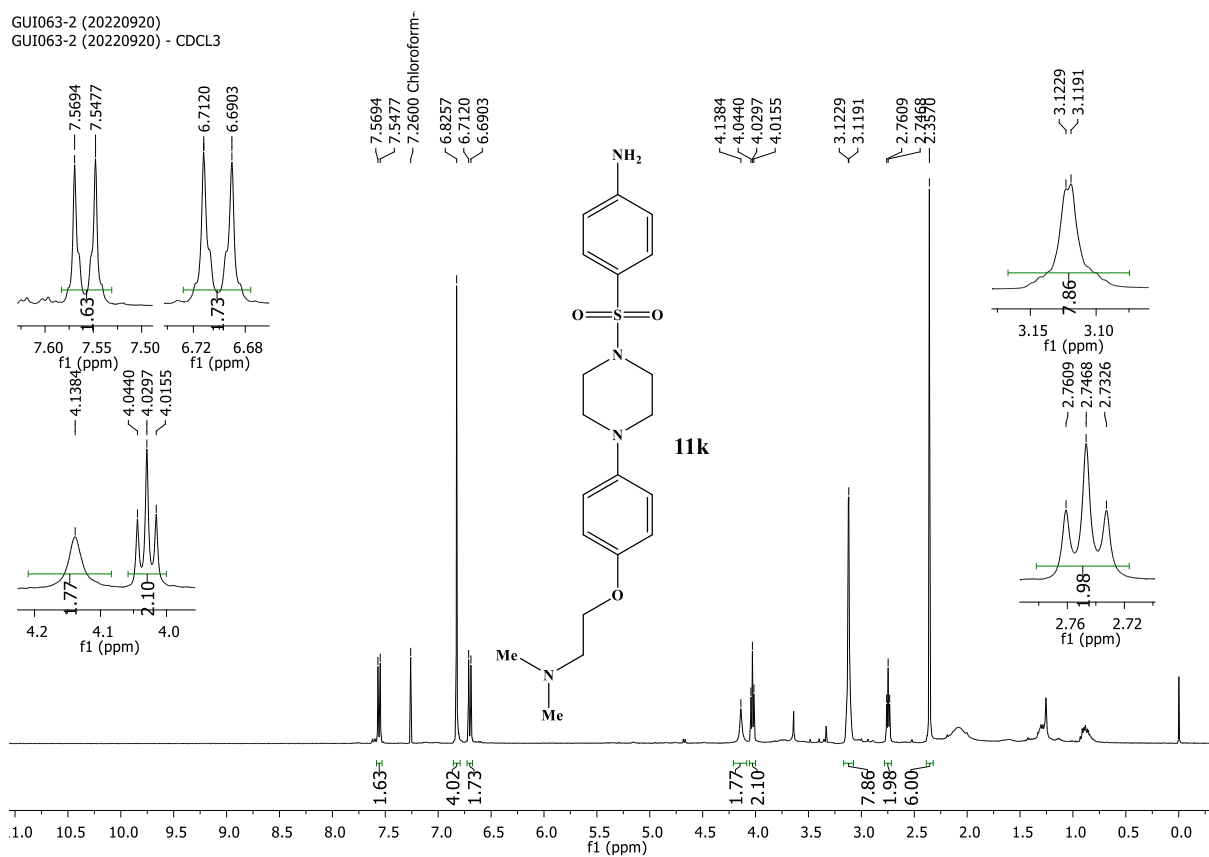
CN(C)CCOC1=CC=C(C=C1)N2CCN(S(=O)(=O)C3=CC=C(C=C3)OC)CC2

11j

13C NMR peaks (ppm):

- 155.73
- 153.82
- 145.42
- 134.32
- 131.48
- 127.98
- 125.81
- 119.19
- 115.51
- 113.87
- 77.16 (CDCl₃)
- 66.34
- 58.37
- 56.54
- 51.24
- 46.27
- 45.84

GUI063-2 (20220920)
GUI063-2 (20220920) - CDCL3



Espectro 49 - RMN de ^{13}C do composto **11k**